

Aus der Universitäts-Strahlenklinik Marburg/Lahn

Direktor: Prof. Dr. F. Heß

Kritische Betrachtung des Chalonkonzeptes

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin des Fachbereiches Humanmedizin
der Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von

Manfred Erbe

aus

Kassel

Marburg 1977

Aus der Universitäts-Strahlenklinik Marburg/Lahn

Direktor: Prof. Dr. F. Heß

Kritische Betrachtung des Chalonkonzeptes

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin des Fachbereiches Humanmedizin
der Philipps-Universität zu Marburg



vorgelegt von

Manfred Erbe

aus

Kassel

Marburg 1977

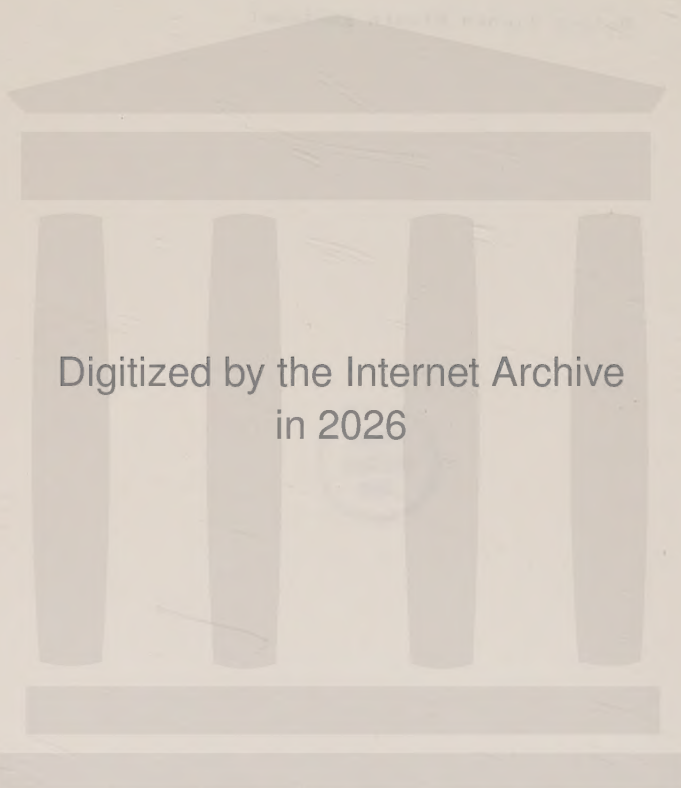


Dekan: Prof. Dr. F. Neurath

Referent: Doz. Dr. F. A. Popp

Correferent: Prof. Dr. H. G. Grundner

Meinen lieben Eltern gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552327_0019

Inhaltsverzeichnis

<u>1. Teil:</u>	Wurzeln der Chalonforschung	Seite	1
1.1.	Einführung	"	1
1.2.	Definitionsprobleme	"	1
1.3.	Die Entdeckung der Chalone: Voraussetzungen	"	3
1.3.1.	Die Epidermisverletzung als standardisiertes Testsystem für Proliferationsvorgänge	"	3
1.3.2.	Beginn einer kybernetischen Theorie der Wachstumsregulation, die Existenz von hemmenden Signalsubstanzen	"	3
1.3.3.	Hinweise für die Existenz kybernetischer Mechanismen für die Einregulierung der Zellmenge	"	5
1.3.4.	Hinweise für die Existenz von Hemmsubstanzen	"	6
<u>2. Teil:</u>	Das Chalonkonzept	"	7
2.1.	Der "klassische" Wundversuch BULLOUGH's am Mäuseohr	"	7
2.1.1.	Durchführung des Wundversuchs	"	7
2.2.	Die Entwicklung der Chalonforschung	"	9
2.2.1.	Übersicht	"	9
2.2.2.	Chalonforschung 1963 - 1969	"	11
2.3.	Die Wirkungscharakteristik der Chalone	"	14
2.3.1.	Die Speziesunspezifität	"	14
2.3.2.	Die Gewebsspezifität	"	14
2.3.3.	Die Reversibilität der Wirkung	"	15
2.3.4.	Die Stresshormone	"	16
<u>3. Teil:</u>	Die verschiedenen Chalone	"	20
3.1.	Das Epidermale Chalon	"	20
3.1.1.	Gewinnung des Epidermalen Chalon als generelles Beispiel für Chalongewinnung	"	20
3.1.2.	Chemische Charakterisierung des Epidermalen Chalon	"	21
3.1.3.	Vorkommen des Epidermalen Chalon	"	22
3.1.4.	Gewebsspezifität des Epidermalen Chalon	"	22
3.1.5.	Reversibilität der Wirkung	"	23
3.1.6.	Lageabhängigkeit des Epidermalen Chalons	"	23

3.2.	Das Leberchalon	Seite	26
3.2.1.	Vorbemerkung	"	26
3.2.2.	Speziesunspezifität	"	27
3.2.3.	Gewebsspezifität	"	27
3.2.4.	Charakterisierung	"	27
3.2.5.	Stresshormone	"	29
3.3.	Das Endometriumchalon	"	29
3.4.	Das Granulozytenchalon	"	29
3.4.1.	Chemische Charakterisierung	"	29
3.4.2.	Speziesunspezifität	"	30
3.4.3.	Gewebsspezifität	"	30
3.4.4.	Reversibilität	"	31
3.5.	Erythrozytenchalon	"	32
3.5.1.	Chemische Charakterisierung	"	32
3.5.2.	Gewebsspezifität	"	32
3.5.3.	Reversibilität	"	32
3.6.	Lymphozytenchalon	"	32
3.6.1.	Chemische Charakterisierung	"	32
3.6.2.	Speziesunspezifität	"	33
3.6.3.	Gewebsspezifität	"	34
3.6.4.	Reversibilität	"	34
3.6.5.	Verschiedenes	"	34
3.7.	Thymuschalon	"	34
3.7.1.	Vorbemerkung	"	34
3.7.2.	Speziesunspezifität	"	35
3.7.3.	Gewebsspezifität	"	35
3.8.	Nierenchalon	"	35
3.8.1.	Vorbemerkung	"	35
3.8.2.	Gewebsspezifität	"	35
3.8.3.	Stresshormone	"	35
3.8.4.	Weitere Aspekte	"	36
3.9.	Das Melanozytenchalon	"	36
3.9.1.	Chemische Charakterisierung	"	36
3.9.2.	Gewebsspezifität	"	36
3.9.3.	Reversibilität	"	37
3.9.4.	Stresshormone	"	37
3.9.5.	Weitere Aspekte	"	37
3.10.	Das Fibroblastenchalon	"	37
3.10.1.	Chemische Charakterisierung	"	37
3.10.2.	Gewebsspezifität	"	38
3.10.3.	Reversibilität	"	38

3.10.4.	Weitere Aspekte	Seite	38
3.11.	Das Talgdrüsenchalon	"	38
3.12.	Das Spermatogonienchalon	"	38
3.12.1.	Nachweis der Existence	"	38
3.12.2.	Gewebsspezifität	"	39
3.12.3.	Speziesunspezifität	"	39
3.12.4.	Reversibilität	"	39
3.13.	Lungenchalon	"	39
3.13.1.	Chemische Charakterisierung	"	39
3.13.2.	Gewebsspezifität	"	39
3.13.3.	Speziesunspezifität	"	39
3.13.4.	Stesshormone	"	40
3.13.5.	Weitere Aspekte	"	40
3.14.	Das Linsenchalon	"	40
3.15.	Das Asziteschalon	"	40
3.15.1.	Chemische Charakterisierung	"	40
3.15.2.	Speziesunspezifität	"	40
3.15.3.	Gewebsspezifität	"	41
3.15.4.	Reversibilität	"	41
<u>4. Teil:</u>	Der Wirkmechanismus der Chalone	"	42
4.1.	Chalone - G_1 - oder G_2 -Inhibitoren ?	"	42
4.1.1.	Vorbemerkung	"	42
4.1.2.	Die verschiedenen Zellphasen	"	42
4.1.3.	Das "Splitting" der Chalone: Wirkung in G_1	"	43
4.1.4.	Das Epidermale G_1 -Chalon	"	45
4.1.5.	Das Verhältnis von G_1 - zu G_2 -Chalon in der Epidermis ("Dichophase-ratio")	"	47
4.2.	Theoriebildungen zum Wirkmechanismus der Chalone	"	48
4.2.1.	Vorbemerkung	"	48
4.2.2.	Das innergewebliche Verhalten der Chalone	"	49
4.2.2.1.	Die Theorie der Freien Diffusion	"	49
4.2.2.2.	Die Theorie der intrazellulären Konzentrierung	"	49
4.2.2.3.	Die Kombinationstheorie	"	50
4.2.3.	Ansatzpunkt der Chalone an bzw. in der Zelle	"	50
4.2.3.1.	Die Gensuppressionstheorie	"	50
4.2.3.2.	Die Kontakthemmungstheorie eine Rezeptortheorie	"	50

4.2.3.3.	Präzisierung der Rezeptortheorie: Zykl. AMP als die intrazelluläre Transmittersubstanz der Chalone	Seite	51
4.2.3.4.	Die Aminosäurentheorie	"	54
<u>5. Teil:</u>	Chalone, Carcinogenese und Tumorwachstum	"	54
5.1.	Chalone und Carcinogenese	"	54
5.1.1.	Vorbemerkung	"	54
5.1.2.	Interaktionen von Chalonon mit Carcinogenen	"	56
5.1.3.	Carcinomentstehung in kybernetischen Systemen	"	57
5.1.4.	Die Entstehung der Malignität	"	60
5.2.	Therapie mit Chalonon ?	"	62
5.2.1.	Prinzipielle Überlegungen	"	62
5.2.2.	Das "Sigmawachstum" der Tumoren	"	64
5.2.2.1.	Begriffsklärung	"	64
5.2.2.2.	Konventionelle Vorstellung: Sigmawachstum als Ausdruck der Tumortheorie	"	65
5.2.2.3.	Neuere Vorstellung: Sigmawachstum als Ausdruck einer spezifischen Wachstumsregulation	"	65
5.2.2.4.	Chalone und Sigmawachstum	"	66
5.2.2.4.1.	Die Chalontheorie des Sigmawachstums	"	66
5.2.2.4.2.	Literaturüberblick: Substanzen, die das Tu- morrowachstum hemmen	"	67
5.2.2.4.2.1.	Allgemeiner Teil	"	67
5.2.2.4.2.2.	Spezieller Teil: Aszites-Tumoren	"	67
5.2.2.2.3.	Das Aszites-Chalon	"	68
5.2.3.	Chalonwirkung auf Tumoren im Experiment	"	69
5.2.3.1.	Vorbemerkung	"	69
5.2.3.2.	Epidermale Tumoren	"	69
5.2.3.3.	Leukämien	"	71
5.2.3.4.	Melanome	"	72
5.2.3.5.	Kritik der Chalonwirkung auf Tumoren	"	73
5.2.3.5.1.	Auslösung von Immunmechanismen	"	73
5.2.3.5.2.	Zytotoxische Effekte	"	73
5.2.4.	Spekulative Anwendungsmöglichkeiten der Chalone	"	77
<u>6. Teil:</u>	Das Dilemma der Chalonforschung	"	82
6.1.	Technische Schwierigkeiten	"	82
6.1.1.	Vorbemerkungen	"	82

6.1.2.	Die Reindarstellung der Chalone	Seite , 82
6.1.3.	Das Assay-System	" 83
6.1.4.	In vitro - in vivo Systeme: Widersprüchliche Ergebnisse	" 84
6.2.	Von Bullough eingeleitete, im nachhinein als Fehlentwicklungen zu klassifizierende Abschnitte der Chalonforschung	" 85
6.2.1.	Vorbemerkungen	" 85
6.2.2.	Einführung der G ₂ -Mitose-Assays	" 85
6.2.3.	Die Rolle der Stresshormone	" 86
6.2.4.	Konstruktion der Freien Diffusion der Chalone	" 86
6.2.5.	Chalone als "Jungbrunnen" ?	" 88
6.2.6.	Voreilige Schlüsse	" 88
6.3.	Der Absolutheitsanspruch der Chalone	
	In Bezug auf die Wachstumsregulation	" 89
	<u>Exkurs:</u> Stimulatoren des Wachstums	" 90
6.4.	Vorschlag: Die Rolle der Chalone im System der Wachstumsregulation	" 91
6.5.	Die Bedeutung der Zellmembranen	" 94
6.6.	Gewebsspezifität der Chalone im Zweifel: Die verunsicherte Situation der Chalonforschung	" 94
6.7.	Schlußbemerkungen	" 96
	Zusammenfassung	" 98

1. Teil Wurzeln der Chalonforschung

1.1. Einführung

50 Forscher trafen sich im Juni 1972 in Brook Lodge, Augusta, Michigan, zur 1. Internationalen Chalonkonferenz ("First Symposium of the International Chalone Conference") unter der Schirmherrschaft des National Cancer Institute (NCI) der USA.

Allein im Jahre 1973 fanden drei Symposien für dieses Spezialgebiet statt.

Der Begriff "Chalon" gehört zum Prüfungswissen für den ersten Abschnitt des Med. Staatsexamens nach der neuen Approbationsordnung (AO); dementsprechend hat er auch in die neueren Lehrbücher der Pathologie (HAMPERL [83], ZOLLINGER [280]) und der Pathophysiologie (SIEGENTHALER 237a) Eingang gefunden. Es hat also den Anschein, daß der Begriff "Chalon" bald zum gesicherten Fundus des medizinisch-biologischen Wissens gezählt werden kann. Trotzdem scheinen die Vorstellungen, bedingt auch durch die Heterogenität der Forschung auf diesem Gebiet, im allgemeinen sehr unterschiedlich zu sein, wenn man von dem Stichwort "Mitosehemmstoff" absieht.

Als Mitosehemmstoffe können jedoch die verschiedensten Substanzen auftreten. Aminosäuren wie Arginin [255] Hormone [99] RNA [1] Prostaglandine und AMP [58] wirken in diesem Sinne je nach Gewebe, zum Teil auch universell. Trotzdem handelt es sich natürlich nicht um Chalone.

Die "normale", physiologischerweise ablaufende Proliferations-tätigkeit und ihre Kontrollmechanismen zu verstehen, ist eine wesentliche und im Grunde unerläßliche Voraussetzung, wenn man sich in einem weiteren, nachfolgenden Schritt von Zellteilungen ein Bild verschaffen will, die im Rahmen eines pathologischen Prozesses zustande kommen. Von einem solchen Ansatz aus kann es u.U. möglich sein, sinnvolle Therapievorschläge zu entwerfen, die sich absetzen von apodiktischen Stichworten wie "mit Stahl und Strahl".

1.2. Definitionsprobleme

Wenn ausgereifte Gewebe ohne ersichtlichen Grund zu wachsen

beginnen, dann ist ohne Zweifel die Wachstumsregulation irgendwo gestört.

Wenn wir es mit ausgewachsenen Geweben zu tun haben, ist die Frage berechtigt: Handelt es sich nicht vielmehr um eine gestörte Regelung des normalen Zellersatzes, weniger des Wachstums an sich?

IVERSEN [137] schreibt dazu: "Das Wachstum der höheren Organismen erfolgt in zwei Phasen. In der ersten Phase, die von der Befruchtung bis zur vollen Reife des Organismus dauert, überwiegt die Bildung neuer Zellen bei weitem gegenüber Zelltod und Zellverlust. Die Organe und der gesamte Organismus nehmen an Gewicht zu. In der zweiten Phase besteht ein Gleichgewicht zwischen Neubildung und Verlust von Zellen. Das Gewicht der Organe nimmt nicht zu, aber trotzdem findet in vielen Geweben ein ständiges Auswechseln von Zellen statt."

Was Wachstum ist, scheint also auch ein sprachliches, ein Definitionsproblem zu sein.

Normalerweise hängen mit Wachstum Begriffe wie Reifung, Entwicklung, Differenzierung zusammen.

Darum seien folgende Abgrenzungen getroffen:

1. Als Wachstum bezeichnen wir im folgenden Prozesse, die mit einer Zell- und Gewebsvermehrung einhergehen; dabei bleibt die Qualität der entstandenen Zellen ohne Belang.
2. Wir können ihm den Zellersatz gegenüberstellen; die Zellteilungen dienen hier der Erhaltung der Gewebsmenge durch Ersatz der zugrundegegangenen Zellen. Es erfolgt keine Gewebsvermehrung.
3. Die Zellregeneration dient ebenfalls der Geweberhaltung; vorausgegangen ist jedoch ein Gewebsdefekt, z.B. eine Wunde. Sie wäre damit eine Sonderform des Zellersatzes, aber auch des Wachstums.
4. Als Wucherung bezeichnen wir ein Wachstum, das über das "normale" Maß hinausgeht; es kann mit Reifung und Differenzierung einhergehen, meistens aber mit Entdifferenzierung.

5. Mit Reifung bezeichnen wir Spezialisierungsabläufe im Laufe eines Zellzyklus.
6. Als Differenzierung bezeichnen wir Gewebsveränderungen, bei denen eine Zellteilung Voraussetzung für das Erreichen weiterer Spezialisierung ist, die entstandenen Zellen also auf eine höhere Stufe der Spezialisierung gelangen als die vorhergehende Zellgeneration.

1.3. Die Entdeckung der Chalone: Voraussetzungen

1.3.1. Die Epidermisverletzung als standardisiertes Testsystem für Proliferationsvorgänge

Das Problem des normalen und pathologischen Wachstums kann von verschiedenen Seiten aus angegangen werden.

Die Chalonforschung wählte zunächst den Weg der Beobachtung des regenerativen Gewebewachstums nach Setzung eines Proliferationsreizes durch Verwundung; damit hatte man ein einfaches Modell gewählt, mit dem an jedem Ort und zu jeder Zeit gleichgeartete Regenerationsabläufe untersucht werden konnten. Die auf dem Gebiet der Wundheilung engagierten Forscher richteten jedoch bis zum Ende der 50er Jahre ihre Aufmerksamkeit vorwiegend auf freiwerdende Stimulatoren der Proliferation, getreu der Theorie vom Wundhormon.

Bei kybernetischer Betrachtungsweise kann die Wundheilung, die als wesentlichstes Merkmal eine Erreichung der alten Zell- und Gewebsmasse beinhaltet, als ein Problem der Konstanthaltung eines Sollwertes angesehen werden.

Dieser heute nicht mehr kühne Gedanke beinhaltet bereits die Entdeckung der Chalone [275 und 276].

1.3.2. Beginn einer kybernetischen Theorie der Wachstumsregulation, die Existenz von hemmenden Signalsubstanzen

Sehen wir uns auf dem Feld der Theorie der Wachstumsregulation um, finden wir zunächst nicht viel.

Die Geschichte der Entdeckung der Chalone beginnt eigentlich mit dem Erscheinen des Buches "Kybernetics" von N. WIENER im Jahre 1948.

Obwohl auch Olav IVERSEN in Oslo um die Mitte der 50er Jahre die Prinzipien der Kybernetik auf den Zellersatz angewendet haben soll [123], hat seine Theoriebildung in der Literatur das geringere Echo hinterlassen.

WEISS [275] hatte schon im Jahre 1955 in einer ersten Arbeit die Möglichkeiten angedeutet, die das damals sehr "populäre" kybernetische Konzept für die Wachstumsregulation eröffnen könnte. Zusammen mit KAVANAU [276] konnte er im Jahre 1957 diese Vorstellungen in mathematische Größen fassen. Es entstand ein mathematisch exaktes System des Zellersatzes. Es beruht auf dem Prinzip der negativen Rückkopplung (negative feedback). Die reiferen Gewebszellen produzieren ein charakteristisches Signal in Form einer frei diffundierbaren Substanz ("anti-template"), welche als eine Art Mitoserepressor die Teilung der unreifen Zellen hemmt (und diesen damit Gelegenheit zur Reifung gibt). Außerdem existieren "templates", die antagonistisch zu den antitemplates sind und die Fähigkeit besitzen, die "generative mass" zu stimulieren. Diese Stimulationswirkung kann nur gebremst werden, wenn die Menge der reifen Zellen groß genug ist, um genügend Hemmsubstanz (antitemplate) herzustellen. Nimmt daher die Menge der reifen Zellen ab, sinkt die Hemmstoffproduktion und die Proliferationsaktivität nimmt zu. Ähnliche Signalsubstanztheorien werden von OSGOOD [117], DRUCKREY [80] und CRILE [73b] vertreten.

Eine unerläßliche Voraussetzung zur störungsfreien Funktion solcher Systeme ist, daß jede reife Zelle pro Zeiteinheit dieselbe Menge Kontrollsubstanz herstellt und unabhängig ist von Umgebungsparametern zufälliger Art, z.B. leichter pH-Schwankungen, Temperaturschwankungen, nutritivem Angebot und vor allem von leichten zytotoxischen Wirkungen. Bei Überproduktion von "antitemplates" würde über kurz oder lang, je nach Halbwertszeit, eine Hypoplasie des Gewebes, bei Unterproduktion, verstärktem Abbau oder Verlust eine Hyperplasie oder ein Tumor resultieren.

Aus der Tatsache, daß vom Gewebe selbst endogene Signalsubstanzen zur Regulation des eigenen Größenwachstums gebildet

werden, ergibt sich eine andere stillschweigende Voraussetzung, die aber erwähnt werden sollte:

Die in einem ausgereiften Organ erreichte Gewebsmasse entspricht damit einer genetisch festgelegten, "natürlichen" Größe; exogene Einflüsse, die theoretisch durchaus in der Lage wären, die Größe eines Organs nach Gesichtspunkten der funktionellen Anforderung in kybernetischer Weise zu steuern und anzupassen [103, S. 217], müssen damit ausgeschlossen werden.

1.3.3. Hinweise für die Existenz kybernetischer Mechanismen bei der Einregulation der Zellmenge

Charakteristisch für kybernetische Systeme sind sogenannte negative und positive Nachschwankungen bei der Einregulierung des Sollwertes, also "Überschießende" Korrekturen, die eine Serie von abnehmenden Oszillationen nach sich ziehen und so schließlich den Sollwert erreichen.

Auf die Zelle, d.h., auf die Mitose bezogen, bedeutet dies, daß nach Einwirkung einer schädigenden Noxe eine vorübergehende Phase vermehrter Zellbildung eintreten muß, also eine Phase der Hyperplasie.

IVERSEN [137] untersuchte die Zellkinetik der Epidermis nach Aufbringung einer krebserzeugenden Substanz (Carcinogen). Es erfolgt zunächst eine Hypertrophie, die aber auf einem Zellödem beruht. Eine Woche später kann jedoch auch eine bedeutende Zellzunahme registriert werden, und zwar um einen Wert von fast 30 %. Dieses Stadium klingt dann wieder langsam ab.

Mit Analogrechenmaschinen versuchte IVERSEN, das gefundene Ergebnis zu bestätigen. "Wie simulierten höheren Verschleiß im Modell und erhielten das Ergebnis, daß auch das Modell bei Abnutzung eine dickere Epidermis zeigte. Wir fanden somit eine brauchbare Isomorphie zwischen Modell und Wirklichkeit." [137]

Bei höherem Verschleiß entsteht also eine Hyperplasie. Es sei angemerkt, daß die Hemmung der DNA-Synthese durch Chalone von einer Erholungsphase gefolgt wird, die sich in einer vermehrten, überschießenden DNA-Synthese äußert [277].

1.3.4. Hinweise für die Existenz von Hemmsubstanzen

Eine ausführliche Übersicht hierzu gibt BURNS [52], dem wir hier im wesentlichen folgen. Die ersten Veröffentlichungen über die wachstumshemmende Wirkung homologer Gewebsextrakte stammen von SIMMS und STILLMANN (1937) [239].

In SAETREN's Untersuchungen (1956, 1963) [230 und 231] konnten die 48-Stunden-Gipfel der Zellproliferation, die nach partieller Hepatektomie oder subtotaler Nephrektomie auftraten, durch Mazerate des homologen Organs unterdrückt werden.

Auf die Existenz von gewebsregulierenden Hemmsubstanzen deuten auch die Versuche von GRISHAM et al. (1966) [105] hin:

Transfusionen von 15-20 ml Blut - das sind 70-80 % der Gesamtblutmenge - von normalen Ratten auf teilhepatektomierte Tiere vermochte die Thymidinverwertungsrate deutlich zu drücken, die normalerweise nach 24 bis 36 Stunden nach partieller Hepatektomie ihren höchsten Wert erreicht. Zwei nachfolgende Transfusionen verschoben den Peak des Einbaus von radioaktivem Thymidin um weitere 24 Stunden.

STICH und FLORIAN [250] berichteten 1959, daß Serum gesunder Ratten, intraperitoneal injiziert die Phase der stärksten Regeneration der Leber um einen Tag verzögern konnte. Die Dauer der Wirkung war also begrenzt.

Aus der Reversibilität ergibt sich, daß die Hemmsubstanz wahrscheinlich keine Zytotoxizität besitzt.

Autotransplantate von Leber und Milz wachsen nicht bevor das Tier eine partielle Hepatektomie (LEONG et al., 1964 [163] ; SIGEL et al., 1963 [237] ; VIROLAINEN [261]) oder Splenektomie (CAMERON und RHEE, 1959 [54] ; METCALF, 1963 [185]) erfährt.

Offensichtlich werden also kontinuierlich Inhibitorsubstanzen produziert, die bei genügender Konzentration in der Lage sind, das Wachstum gewebsspezifisch zu bremsen.

Wir können feststellen, daß sowohl vor [54] als auch nach BULLOUGH'S Inauguration und Definition bestimmter Inhibitoren als Chalone im Jahre 1962 eine ganze Anzahl Untersuchungen über gewebsspezifische Hemmsubstanzen vorliegen.

Es darf angenommen werden, daß es sich bei den beschriebenen Hemmsubstanzen zu großen Teil um Chalone oder chalonähnliche Substanzen gehandelt haben wird [52] .

2. Teil Das Chalonkonzept

2.1. Der "klassische" Wundversuch BULLOUGH'S am Mäuseohr

2.1.1. Durchführung des Wundversuchs.

WS. BULLOUGH vom Mitosis Research Laboratory in London, der "Nestor" der Chalonforschung, beschäftigte sich gegen Ende der 50er Jahre mit dem Vorgang der Wundheilung und seinem Zustandekommen. Dabei hatte er eine Technik entwickelt, die die Beobachtung speziell kleinerer Verletzungen möglich machte [24] .

Bei seinen Versuchen am verletzten Mäuseohr bemerkte er etwas, was der Lehrmeinung auf diesem Gebiet widersprach. Er entdeckte Anzeichen dafür, daß nicht - wie allgemein angenommen - Wundhormone durch die Verletzung freigesetzt werden und die für die Regeneration erforderlichen Zellteilungen in Gang setzen, sondern im Gegenteil vorher noch vorhanden gewesene Hemmstoffe durch ihr Fehlen den Prozeß auslösen [25 und 26] .

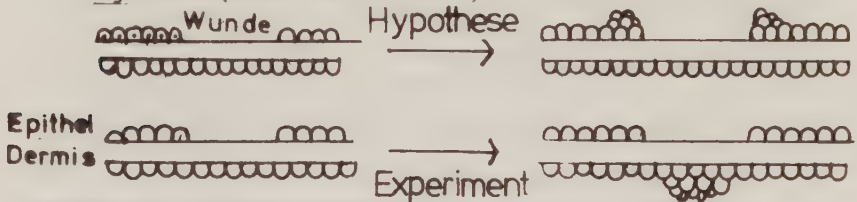
Im einzelnen sah der Versuch so aus:

Auf der einen Seite des Mäuseohres wurde eine umschriebene Verletzung und Zerstörung der Epidermis angebracht.

BULLOUGH nahm nun an - und damit befand er sich in Übereinstimmung mit der damals herrschenden Lehrmeinung - , daß die Zellregeneration vom Rande der Wunde in Gang gesetzt werde: Eben von dort sollte auch das Wundhormon freigesetzt werden. BULLOUGH's entscheidender Gedanke war es nun, einmal auf der unverletzten Seite des Mäuseohres nachzuschauen: Hatte sie die Maßnahme reaktionslos überstanden oder waren Veränderungen im Sinne einer "Mitreaktion" eingetreten?

Dies war tatsächlich der Fall; auch am unverletzten Epithel waren Zellteilungen eingeleitet worden und hatten zu einer kleinen, aber meßbaren Polsterbildung geführt. Zu ihrer Überraschung mußten WS. BULLOUGH und EB. LAURENCE aber konstatieren, daß das hyperplastische Polster gerade gegenüber der Wunde auftrat und am stärksten dort, wo sich das Zentrum der

Wunde hinprojizierte; über den Wundrändern aber, von wo das Wundhormon seine Wirkung entfalten sollte, wurde keine Reaktion gesehen (siehe Abb. 1 und 2).



BÜLDUGH und LAURENCE glaubten, daraus folgende Schlüsse ziehen zu können:

1. Das auslösende Moment der Wundheilung, wie es sich aus diesem Versuch darstellte, ist nicht zu suchen in Mechanismen einer positiven Rückkopplung (Wundhormon), sondern in solchen einer negativen Rückkopplung: also im Wegfall blockierender Elemente der Zellteilung.
2. Der verantwortliche Stoff muß durch Dermis und Epidermis diffusibel sein.

Es sei an dieser Stelle bereits hingewiesen, daß der an zweiter Stelle genannte Schluß sicherlich kritikwürdig ist; es geht aus dem Versuch nicht eindeutig hervor, ob das negative feedback Phänomen auf der Basis chemischer Substrate zustandekommt. Wenn dies so ist, muß allerdings die freie Diffusion des Substrates postuliert werden.

2.1.2. Auswertung des Wundversuchs: Eigenschaften der Hemmsubstanzen, Definition der Chalone

Bei einer negative feedback Theorie der Wachstumsregulation mit Hilfe von Inhibitorsubstanzen muß weiterhin folgendes vorausgesetzt werden:

1. Daß der Inhibitor von jeder Zelle ständig und anteilig produziert wird (wie bereits in 1.3.4. aufgeführt).
2. Daß er imstande sein muß, von Zelle zu Zelle zu gelangen.
3. Daß die mitosehemmende Wirkung gewebsspezifisch sein muß.

Die Gewebsspezifität des Hemmfaktors muß gefordert werden, um zu gewährleisten, daß nach Verletzung sich die kompensatorische

Regeneration nur auf das vorletzte Gewebe bezieht und keine unsinnigen Mitreaktionen in anderen Geweben auslöst.

BULLOUGH's erste Charakterisierung des vermuteten Inhibitors sah deshalb folgendermaßen aus: "An internal secretion produced by a tissue for the purpose of controlling by inhibition the mitotic activity of the cells of the same tissue" [25].

Später [28] schlug BULLOUGH vor, diese Substanzen "Chalone" zu nennen. Der Begriff stammt ursprünglich von SCHÄFER [232], der ihn aus Gründen der sprachlichen Korrektheit dem Hormon gegenübergestellt hat.

Die Bezeichnung Hormon war von STARLING für bestimmte chemische Botenstoffe ("chemical messengers") eingeführt worden; Botenstoffe, die im Stoffwechsel hemmende Wirkungen zeigen, wurden von STARLING als "hemmende Hormone" [249] bezeichnet. Um diese etwas absurde Sprachregelung (griechisch *δρμάω* = ich reize, ich stachele an) abzuschaffen, machte SCHÄFER 1916 den Vorschlag, in Zukunft lieber von Chalonen als von hemmenden Hormonen zu sprechen (von *χαλάω* = ich bremsen ab, mache langsam). Dieser Vorschlag setzte sich jedoch nie richtig durch, sodaß BULLOUGH im Jahre 1962 den Begriff aufgreifen und neu ausfüllen konnte.

2.2. Die Entwicklung der Chalonforschung

2.2.1. Übersicht

Obwohl nicht nur BULLOUGH, sondern zur gleichen Zeit auch TSANEV in Sofia [256a] und IVERSEN in Oslo [130, 132 u. 129] zu der Anschauung gekommen waren, daß zumindest das Wachstumsregulationssystem der Haut über negative Rückkopplung funktionieren könne, obwohl im September 1959 die ersten Versuche gemacht wurden, diesen Inhibitor zu isolieren [161] und 1962 auch ein wirksamer Extrakt demonstriert werden konnte [28], obwohl schließlich 1964 erste chemische Merkmale des Inhibitors mitgeteilt werden konnten, war die allgemeine Aufnahme der Chalone in der Wissenschaft äußerst reserviert.

In Helsinki wurde die Chalone 1965 zum erstenmal auf einem größeren Kongreß vorgestellt:

"Die Aufnahme war eine des totalen Unglaubens oder Skepsis" [161]

(" The reception was one of total disbelief or skepticism").

Und noch im Jahre 1968 auf dem ersten Treffen der Chalonwissenschaftler sah die Landschaft recht armselig aus:

"There were only 12 people who could possibly participate and only three chalones were represented" [161].

Erst zu Beginn der 70er Jahre trat eine stürmischere Entwicklung ein, sodaß E.B. Laurence auf den schon erwähnten Chalonkongreß des National Cancer Institute (NCI) der USA im Juni 1972 feststellen konnte, daß nunmehr 12 verschiedene Chalone bekannt seien und aktive Chalonforschung in zumindest 13 Ländern betrieben werde [161].

Dies bedeutet jedoch keineswegs, daß die Chalonforschung problemlos geworden ist.

Die Chalonforscher arbeiten unter einem eigentümlichen Zwiespalt. Auf der einen Seite sind sie von der bestechenden Einfachheit des Chalonkonzeptes begeistert: "The simplicity and elegance of the idea of a specific endogenous inhibitor, a chalone, controlling the mitosis of normal cells are very compelling and very exciting" [123].

Auf der anderen Seite können sie das Substrat ihrer Nachforschungen im chemischen Sinne nicht erschöpfend definieren und müssen es funktionell beschreiben.

Zitat aus der selben Veröffentlichung (Übersetzt):

"Das Wesentliche des Chalonkonzeptes ist es, daß es eine Klasse von Verbindungen umfaßt, die chemisch noch richtig definiert werden müssen, aber fähig sind, die Mitoseaktivität eines gegebenen Zelltyps zu hemmen" [123].

Selbst auf dem Chalonkongreß 1972 gelang es nicht, eine umfassende und dennoch stringente Definition von Chalonen zustandezubringen [182], aber es gab eine prinzipielle Übereinstimmung über vier grundlegende Charakteristika:

1. Chalone hemmen die Mitose in vivo und in vitro
2. Ihre Wirkung ist physiologisch und reversibel, also nicht zytotoxisch
3. Sie werden von den reifen Zellen des Gewebes synthetisiert, auf das sie einwirken.
4. Sie sind gewebspezifisch, aber nicht speziesspezifisch.

Neuerdings werden die Chalone auch kurzerhand zu den Hormonen hinzugezählt [241]: "Als echte Hormone sind die Chalone in außerordentlich geringen Mengen wirksam" -, während BULLOUGH sie bereits als einen Eckpfeiler des endokrinen Systems begreift: "The endocrine system comprises: The chalone, each of which regulates the tissue within it is produced; the hormones each of which regulates a different tissue from that in which it is produced; and the pheromones, each of which is produced in one individual to regulate a tissue in another individual" [45] .

2.2.2. Chalonforschung 1963 - 1968

Diese Zeit der Chalonforschung kann, anders als die zwischen 1960 und 1962, zwar nicht mehr als "Einmannbetrieb" bezeichnet werden, doch steht sie nach wie vor eindeutig im Zeichen von W.S. BULLOUGH.

Die Veröffentlichungen sind spärlich: Im gesamten Jahre 1963 wird auf dem soeben (1962) definierten Gebiet nichts Neues bekannt.

Im Jahre 1974 erscheinen drei Publikationen: Zwei stammen von BULLOUGH, die dritte von dem Finnen RYTÖMÄ.

1. Da BULLOUGH die Bedeutung einer chemischen Charakterisierung erkannt hatte und sich von ihr eine entscheidende Belebung seines Forschungsgebietes versprach, unternahm er in dieser Richtung einen Vorstoß. Wenn dieser auch kein eindeutiger Fehlschlag war: Mehr als "A preliminary attempt at isolation" [30] konnte man ihn wirklich nicht nennen.

Immerhin war nunmehr eine Ahnung vorhanden, wie man sich ein Chalon vorzustellen hat: Ein basisches Glykoprotein mit einem MG von etwa 25000; außerdem erwies sich das Epidermale Chalon als instabil in der Hitze [30].

2. Erst in Gegenwart von Adrenalin ist das Chalon in der Lage, seine volle Wirkung zu erreichen. BULLOUGH glaubt, daß diesem Umstand die Bildung eines Chalonadrenalin-Komplexes zugrunde liegt [29]. Auf diese Weise ließen sich die tageszeitlichen Schwankungen der Mitoseaktivität, die BULLOUGH in einer vorausgehenden Arbeit festgestellt hatte [27], er-

klären und in das Chalonkonzept integrieren.

3. In ersten Experimenten konnte RYTÖMAA die Existenz spezifischer Hemmsubstanzen auch im Rattenserum demonstrieren.

Im Jahre 1965 bestätigen IVERSEN und ELGJO die inhibitorische Wirksamkeit des als "Chalon" bezeichneten Epidermisextrakts. Ansonsten tut sich auch in den Jahren 1965 und 1966 nichts Wesentliches, wenn man von einigen spekulativen Artikeln absieht [131, 31 u. 32] .

Insgesamt gesehen ist diese Entwicklung zu diesem Zeitpunkt sechs Jahre nach dem klassischen Wundversuch und vier Jahre nach der Einführung des Chalonbegriffs, natürlich mehr als enttäuschend für einen Wissenschaftler wie BULLOUGH, der glaubt, den dritten, noch fehlenden Eckpfeiler des endokrinologischen Systems entdeckt zu haben.

Für BULLOUGH gab es nur einen Grund, der ihm erklären konnte, warum seine Forschung so wenig Anklang gefunden hatte: Die äußerst schwierige Isolierungsprozedur der Chalone. Noch war es ja nicht annähernd gelungen, Chalone rein darzustellen. Es war BULLOUGH klar, daß er hier anzusetzen hatte.

Arbeitsvorgänge, die nötig sind, um aus einer Tonne Gewebe schließlich 0,1 mg Chalon zu erhalten, übersteigen aber die technischen und finanziellen Möglichkeiten sogar der bestausgerüsteten Institute und Labore. So sah BULLOUGH nur noch eine Möglichkeit, wenn seine Entdeckung nicht untergehen sollte: Er benötigte die Hilfe der pharmazeutischen Industrie.

Vom Jahre 1967 an finden sich in den Publikationen Dankesworte, die an die Adresse des holländischen Pharmakonzerns Organon gerichtet sind:

"This material was generously supplied by Dr. W. HONDIUS BOLDINGH, Organon N.V." [173] .

"The epidermal chalone was prepared specially for us by Dr. W. HONDIUS BOLDINGH, N.V. Organon, to whom we are greatly indebted" [157] .

"The epidermal chalone, prepared from pig skin extracts by N.V. Organon, Oss, The Netherlands, was in the form of a partially purified, 71-80 percent ethanol precipitate" [37] .

Außerdem in: [84, 41, 161, 223, 189].

Tatsächlich wurde mithilfe der Organonunterstützung schon bald eine Forschung in größerem Rahmen möglich.

Das Jahr 1967 verzeichnet zwar noch eine geringe Rate von drei Veröffentlichungen, von denen die wichtigste wiederum aus BULLOUGH's Institut kommt:

1. BULLOUGH fügt dem Profil der Chalone das Element der spezieunspezifischen Wirkung hinzu. Er weist nach, daß Mäuseepidermis nicht nur durch homologe Extrakte geblockt werden kann, sondern auch durch Extrakte einer Reihe weiterer Wirbeltierarten: Chalon vom Meerschwein, Kaninchen, Hausschwein, Dorsch und nicht zuletzt vom Menschen erweisen sich bei Anwendung auf Mäusehaut als in gleicher Weise wirksam [34].
2. IVERSEN und ELGJO überprüfen die Chalonwirkung auf haarloser Mäuseepidermis [135].
3. E. RANDERS HANSEN testet die Chalonwirkung an Zahnfleisch- und Zungenepithel der Maus [209].

Das Jahr 1968 könnte man in mancher Hinsicht als das Jahr des eigentlichen Beginns der Chalonforschung bezeichnen.

1. Es erscheinen mehr Veröffentlichungen als in allen Jahren zuvor.
2. HONDIUS BOLDINGH führt eine erste genaue Chalonanalyse durch.
3. Es werden andere Gewebe in Angriff genommen und auch hier Chalone gefunden: Granulozyt [221, 222], Melanozyt [36, 189] und Linse [262].
4. Man beschäftigt sich mit der Chalonempfindlichkeit von Tumoren und Tumorzellen und kann Tumorregression feststellen (Chloroleukämie [323], V x 2 Tumor der Epidermis [37], Mäuse- und Hautmelanom [36, 189]).
5. Der Effekt von Chalon auf die DNS-Synthese wird erstmals untersucht [6].
6. Der Effekt des Hydrocortisons als des zweiten Stresshormons wird untersucht [35].

7. Die Existenz von Antichalone wird vermutet [221, 222].

8. Es erscheint die erste kritische Arbeit über die Auswirkungen der Chalone, einmal therapeutisch in der Tumorthherapie eingesetzt zu werden [137].

Die Entwicklung in den weiteren Jahren macht eine Schilderung der chronologischen Abfolge, die zugleich sinnvoll sein soll, unmöglich.

Die Ergebnisse dieser Jahre finden sich thematisch abgehandelt in den folgenden Kapiteln.

2.3. Die Wirkungscharakteristik der Chalone

2.3.1. Die Speziesunspezifität

Diese war - wie im Kapitel 2.2.2. bereits berichtet - von BULLOUGH 1967 nachgewiesen worden und war danach unumstritten. Sie wurde zwar später sporadisch überprüft, konnte dabei jedoch in jedem Fall bestätigt werden. Als Beispiel sei nur die Arbeit von VERLY [259] genannt.

2.3.2. Die Gewebespezifität

"The word 'chalone' brings to the mind of many investigators tissue specificity" [270b], schreibt J. VOORHEES.

In demselben Sinn äußert sich F. MARKS [173]: "Chalone-like factors must have one essential quality in common - tissue specificity of their action".

Das bedeutet, daß die Eigenschaft "Gewebespezifität" als das charakteristische Merkmal der Chalone und als entscheidendes Moment der Theorie der Gewebsregulation durch Chalone angesehen wird.

Anm.: Eine gewebsspezifische Wachstumsregulation setzt keineswegs zwingend gewebsspezifische Regulatorsubstanzen voraus; d.h., es gibt durchaus Denkmodelle, die eine spezifische Wachstumsregulation auch ohne Mitwirkung gewebsspezifischer Kontrollsubstanzen zulassen würden. Die nach Verletzungen auftretende Hyperämie ist eine ganz umschriebene Reaktion; sie beschränkt sich auf das zerstörte Ge-

websgebiet. Sie könnte, folgt man einer Hypothese SIMNETT's und FISHER's, den Zweck haben, die Inhibitor-substanz auszuwaschen: "Da die Änderungen der Durchblutung hochspezifisch sein können, brauchten die Kontrollsubstanzen nicht gewebsspezifisch zu sein in ihrer chemischen Struktur" · 244 ·. Die ausgewaschene Substanz müßte dann jedoch extrem kurzlebig sein, um nicht auf andere Organe nach der Ausspülung einzuwirken. Als Modell führt SIMNETT die Steroidhormone an; sie kontrollieren das Wachstum der von ihnen abhängigen Organe und haben kurze Halbwertszeiten (Oestrogene 2,2 Minuten).

Es zeigte sich jedoch bald, welcher Vorteil mit der Testung der Gewebsspezifität verbunden ist: Sie kann Aufschluß geben, ob eventuell ein unspezifischer Effekt (der nicht in der Chalonwirkung begründet liegt) Ursache einer Depression des Zellzyklus ist. Solche unspezifische Hemmungen können sich z.B. auf zytotoxischer und immunologischer Basis abspielen.

2.3.3. Die Reversibilität der Wirkung

Die Reversibilität der Wirkung muß von einer physiologischen Kontrollsubstanz gefordert werden, um Zytotoxizität auszuschließen. In bestimmten Fällen kann aber trotz der Mitwirkung zytotoxischer Einflüsse die Reversibilität vorgetäuscht werden; denn Zytotoxizität braucht nicht in jedem Fall mit dem endgültigen Absterben der Zelle einherzugehen. Die Schädigung kann reversibel sein; d.h., die Zelle kann sich nach dem Einwirken der Schädlichkeit wieder erholen, wenn die einwirkende Dosis dies erlaubt. Für den Untersucher kann dies als Reversibilität der Wirkung imponieren!

Eine ausgezeichnete Übersicht über das hier angesprochene Problem gibt J.C. HOUCK [123]: Ein großes Spektrum verschiedener Gewebe, so schreibt HOUCK sinngemäß, enthält physiologischerweise ein noch größeres Spektrum toxischer Substanzen. Quantitativ das wahrscheinlich wichtigste Element sei das Komplement. Es enthält u.a. eine Phospholipase und andere Hydrolasen, die - definitionsgemäß - zytolytisch wirken. Schon Spuren der Verunreinigung mit solchen Substanzen führen

zu zytolytischen Nebenwirkungen, die zu einer Beeinträchtigung des Stoffwechsels und damit des Ablaufs des Zellzyklus führen können. Der Ablauf des Eintritts des Zelltods sei hier kurz aufgeführt: Zuerst Beeinträchtigung der Thymidininkorporation in die DNS, dann Beeinträchtigung der Uridin- und Phenylalaninverwertung.

Einige Stunden später: Freisetzung zuvor inkorporierten radioaktiven Chrms. Kurz danach wird Laktatdehydrogenase aus der Zelle in den Extrazellulärraum freigesetzt, die Zelle zeigt im Mikroskop keine lebensfrische Farbe mehr.

Später, selbst nach der Zerstörung der normalen Zellmorphologie, kann man noch statistisch signifikante Aktivitäten der Phosphorylierung, des O_2 -Verbrauchs und der Glukoseverwertung finden. Die Überlebenszeit des Mitochondriums übertrifft die übrigen Organellen und die ganze Zelle sogar um ein beträchtliches [123].

Solche Veränderungen sind natürlich leicht zu bemerken; die Mitwirkung von zytotoxischen Substanzen dagegen absolut auszuschließen, ist ein fast undurchführbares Unterfangen: "Hence the best one can do to render cytotoxicity improbable would be to demonstrate that the chalone action seems to be cell specific and reversible" [123].

Im allgemeinen kann man nämlich davon ausgehen, daß sich zytotoxische Momente in unterschiedlichen Geweben gleichmäßig bemerkbar machen und keinen Zelltyp eindeutig bevorzugen.

2.3.4. Die Stresshormone

Zu den charakteristischen Merkmalen der Chalone war über eine geraume Zeit (ca. 1964 bis 1971) auch ihre Abhängigkeit von Stresshormonen gezählt worden. Es galt als erwiesen, daß die Chalone zur Ausübung ihrer vollen Wirksamkeit Adrenalin und Hydrocortison, vornehmlich aber Adrenalin, benötigten: "A mitotic inhibition can only be ascribed to the epidermal chalone if it satisfies two criteria: it must be epidermis-specific and it must be dependent on the presence of trace amounts of adrenaline" [37].

Wir hatten bereits in der kurzen Übersicht der frühen Chalon-

forschung erwähnt, daß BULLOUGH zu dieser Anschauung im Anschluß an eine eigene Arbeit über die tageszeitlichen Schwankungen der Mitose-tätigkeit kommen war. Im einzelnen sollte die Verknüpfung von Chalon und Adrenalin durch die Bildung eines Chalon-Adrenalinkomplexes zustande kommen; ohne Adrenalin, so BULLOUGH, sei das Chalon unwirksam [29]. Zugleich ergab sich damit eine bestechende Möglichkeit, Chalone zu identifizieren und sie von anderen Hemmsubstanzen durch einen einfachen und schnellen Test abzugrenzen, der schneller als die Testung der Gewebsspezifität durchzuführen war. Dieser Chalon-Assay, von BULLOUGH "discriminative test" genannt, umfaßt folgendes:

Den fraglichen Extrakt läßt man insgesamt etwa 10 Stunden auf frisches Gewebe in vitro einwirken. Adrenalin braucht zunächst nicht zugesetzt zu werden, da sich im Gewebe noch endogenes Adrenalin befindet. Normalerweise tritt nun nach vier Stunden eine Senkung des Mitoseindex ein. Danach ist das vorhandene Adrenalin zerfallen und die Mitosehemmung läßt nach. Die Adrenalinabhängigkeit und damit die Chaloneeigenschaften des Extraktes gelten jedoch erst dann als bewiesen, wenn nun nach Adrenalin-zusatz und Ablauf einer neuerlichen 4-Stunden-spanne eine deutliche Mitosehemmung auftritt.

Bei folgenden Untersuchungen wurde der "discriminative test" herangezogen: [158, 159, 177, 178, 262, 263ab].

IVERSEN [136] berichtet sogar, er habe mithilfe des discriminative test die Mitosehemmung über 4 Tage aufrechterhalten können; ein Befund, der angezweifelt werden muß, weil innerhalb eines solchen Zeitraumes die verwendeten Gewebe in vitro sehr leicht denaturieren [174].

Daß die Chalon-Adrenalinkomplex-Theorie heute gescheitert ist, liegt nicht nur darin begründet, daß Versuche bei Organon, einen solchen Komplex herzustellen, gescheitert sind [160]. Die gefundenen Versuchsergebnisse sind einfach zu wechselhaft. Nach Durchsicht der Literatur liegen nur zwei Publikationen vor, die einen solchen Komplex nahelegen können [37, 41]. Die Applikation von Chalon, Adrenalin oder Hydrocortison allein

ergab keine Hemmwirkung; eine Kombination der Stresshormone war dagegen bereits wirksam. Bei zusätzlicher Chalongabe war dann eine ausgeprägte Hemmwirkung festzustellen; von einer Potenzierung der Hemmwirkung konnte aber nicht die Rede sein, bestenfalls von einer Addierung.

Eine Ausnahme macht hier das Nierenchalon [62]: Hier zeigten sich gewisse Anzeichen für eine Potenzierung der Chalonwirkung durch Stresshormone, doch entfalten diese auch ohne das Chalon eine Hemmwirkung von 58 %. BULLOUGH und LAURENCE hatten ihre Komplextheorie inzwischen bereits abgeschwächt. Sie sprachen nunmehr von einer Vermehrung der antimitotischen Wirkungskraft. "The actual manner of interaction of chalone, adrenaline and hydrocortisone is quite unknown" [35].

Später stellt LAURENCE definitiv fest, daß Adrenalin und Hydrocortison nicht als Cofaktoren des Chalons aufzufassen sind. Zu stark hatten sich die Anzeichen dafür vermehrt, daß das Chalon auch ohne Stresshormone eine deutliche Hemmwirkung entfalten konnte.

VOLM benötigt bei seiner Arbeit mit Leberchalon [264]-im Gegensatz zu VERLY [254]-keine Stresshormone; Auch das Melanozytenchalon DEWEY's [77] verlangt keine Stresshormone.

CHOPRA [61] benutzte 7 Tage alte Gewebeskulturen - endogenes Adrenalin mußte hier mit größter Sicherheit zerfallen sein - und trotzdem wurde der Chalonextrakt wirksam.

Für in vivo Versuche versteht es sich von selbst, daß die Applikation von Stresshormonen überflüssig ist. Ein endogener Spiegel dieser Substanzen ist ja - ähnlich wie bei frischen Gewebsextrakten - vorhanden.

Anders liegen die Verhältnisse bei adrenaletomierten Tieren. Deshalb überprüften LAURENCE und HANSEN die Wirkung von Chalon an adrenaletomierten Mäusen in vivo [157]. Das Ergebnis war "total unerwartet". Die gemessene Hemmung war bei diesen Tieren gleich hoch wie bei den nicht operierten.

LAURENCE und HANSEN resumieren: "All diese Resultate zusammengekommen ergeben keine Veranlassung dazu anzunehmen, daß Adrenalin als Cofaktor des epidermalen Chalon agiert oder daß

Hydrocortison auf direktem Wege die Wirkung des Epidermalen Chalons verlängert" (Übersetzte Fassung) [157] .

Wie sind nun die unterschiedlichen Ergebnisse zu erklären ? Zunächst einmal durch eine unabhängige Eigenwirkung der Chalone ohne Stresshormone. Eine solche wurde in folgenden Arbeiten festgestellt:

1. An adrenaletomierten Mäusen [157]
2. An zwei Melanomarten [36, 189]
3. An leukämischen Zellen [323]
4. An Epidermis [178]
5. An Leberzellen [259]
6. An Nierenzellen [62]

In allen diesen Arbeiten konnte aber jeweils durch Stresshormone verstärkt werden.

Es bestehen Anzeichen dafür, daß der Verwirrung, die durch die Hypothese des Chalon-Adrenalin-Komplexes in die Chalonforschung hineingetragen worden ist, eine Eigenwirkung der Stresshormone auf die Mitosetätigkeit zugrunde liegt. Jedenfalls scheint die Ansicht von BULLOUGH, daß Adrenalin die Mitose nicht von selbst hemme [37] , nach Durchsicht der Literatur ganz einfach falsch zu sein.

Anzeichen für eine Eigenwirkung der Stresshormone - auch die oben erwähnten sechs Punkte gehören bis zu einem gewissen Grade hierzu - sind weiterhin folgende:

1. FRANKFURT [93] fand, daß Adrenalin den Übergang von der G₂- zur S-Phase hemmt.
2. HENNINGS [112] berichtet, daß Glucocorticoide auf die Mitoserate und die DNS-Synthese hemmend wirken.
3. Es ist auch bekannt, daß Hydrocortison und Adrenalin die Proliferationstätigkeit bei der Leberregeneration behindern [259] .
4. Wie wir in Kapitel 4.2.3.3. zeigen werden, wirkt das von BULLOUGH beschriebene Chalon wahrscheinlich über eine Erhöhung des intrazellulären c-AMP-Spiegels auf die Proliferationsbereitschaft der Zellen ein, ebenso wie Adrenalin. Es ist daher sicherlich möglich, daß Chalone und Adrenalin wegen ihres gemeinsamen "Übersetzers" c-AMP in ihrer Wirkung interferieren; damit könnten die wechselnden Meßwerte der

Mitosehemmungssteigerung nach Stesshormonzugabe durchaus erklärt werden.

Besonders von EB. LAURENCE ist eine weitere Hypothese propagiert worden:

Da ein direktes Zusammenwirken von Stesshormonen und Chalonen im Sinne eines Komplexes widerlegt ist, stellt er sich vor, daß aus der Dermis ein mitotischer Stimulator in die Epidermis gelangt [159, 160]. Dieser könne von Adrenalin abgeblockt oder zerstört werden, während Hydrocortison seine Produktion verhindert. Dies entspricht zwar zum Teil der ursprünglichen Theorie von WEISS und KAVANAU muß jedoch - da keinerlei substantiierte Hinweise dafür vorliegen - als Spekulation aufgefaßt werden.

3. Teil Die verschiedenen Chalone

Im folgenden sollen die einzelnen bisher bekannten Chalone vorgestellt werden und dabei durch ihre Eigenschaften Gewebespezifität, Speziesunspezifität und Reversibilität ihrer Wirkung als solche charakterisiert werden. Außerdem wird gezeigt, wie weit jeweils die chemische Charakterisierung gediehen ist. Das Zusammenspiel mit den Stresshormonen wird dagegen nur in Einzelfällen näher ausgeführt.

3.1. Das Epidermale Chalon

Das Epidermale Chalon wurde zuerst untersucht; es entstammt dem am leichtesten zugänglichen Gewebe und ist deshalb - neben dem Granulozytenchalon - auch das bisher am weitesten erforschte.

3.1.1. Gewinnung des Epidermalen Chalons als generelles Beispiel für Chalongewinnung

Die ersten Versuche der Isolation fanden - wie bereits erwähnt [161] - im September 1959 in London statt; also noch bevor BULLOUGH die Ergebnisse seines Wundversuchs bekannt gegeben hatte.

Die Chalongewinnung ging damals folgendermaßen vonstatten: Die Mäuseohren wurden zunächst abgetrennt und dann in einen Glasmazerator gegeben. Die Wirkung der entstandenen Flüssigkeit

wurde dann auf kleinen Mäuseohrstückchen geprüft, indem man den Ansatz bei 38°C für vier Stunden unter Zugabe von Colcemid inkubierte.

Später wurde das Rohmaterial durch Schaben der haarlosen Epidermis gewonnen. Das abgeschabte Material wurde dann in einem Potter Homogenisator mazeriert und bei 3000 Umdrehungen zentrifugiert. Dies war jahrelang die Standardmethode, um Epidermisextrakt zu erhalten. Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, daß wir im Verlauf der weiteren Besprechung keine strange Unterscheidung zwischen bloßen Gewbsextrakten und höchstgereinigten Gewbsextrakten im Sinne der Chalone machen können und werden.

3.1.2. Chemische Charakterisierung des Epidermalen Chalons

Die Ergebnisse der ersten Versuche BULLOUGH's im Jahre 1964, das Epidermale Chalon zu charakterisieren, hatten wir bereits im Kapitel 2.2.2. mitgeteilt.

HONDIUS BOLDINGH von Organon konnte im Jahre 1968 das Epidermale Chalon folgendermaßen charakterisieren:

Epidermales Chalon ist wahrscheinlich ein Makromolekül mit antigenen Eigenschaften und einem Molekulargewicht von 30000 bis 40000. Der Isoelektrische Punkt liegt zwischen 5 und 6. Es ist entweder ein Protein oder ein Glycoprotein, das bei sehr niedrigem pH stabil ist, im alkalischen Milieu jedoch leicht zerstört wird [116].

1972 gibt EB. LAURENCE die physikochemischen Eigenschaften des Epidermalen Chalons so an:

Das Epidermale Chalon hat Proteincharakter, ist also primär aus Aminosäuren aufgebaut. Kohlenhydratanalysen zusammen mit der Einwirkung von proteolytischen Enzymen zeigen, daß es sich um ein einfaches Protein oder Glycoprotein handeln muß. Die bestgereinigten Proben erzielten eine so große Homogenität, daß mit immunochemischen Methoden, Gel-Elektrophorese und Ultrazentrifugation kaum noch Verunreinigungen nachgewiesen werden konnten.

Das Molekulargewicht liegt zwischen 30000 und 40000 (bestimmt durch Säulenchromatographie und Ultrazentrifugation).

Isoelektrischer Punkt: Zwischen 5,2 und 6,0.

Das Spektrum im UV-Licht zeigte eine allmählich abnehmende Extinktion mit ansteigender Wellenlänge zwischen 220 und 300 nm. Die spezifische optische Rotation lag ungefähr bei -80° (nicht-spiralig, nonhelical).

Das Epidermale Chalon wird durch Trypsin denaturiert, hingegen

nicht durch Pepsin; es ist stabil bei niedrigem pH und wird völlig denaturiert bei pH 9; es ist bei Raumtemperatur in steriler Lösung für eine Woche stabil, die Aktivität geht dann im Verlauf von acht Wochen verloren.

Bei 38°C ist das Chalon 10 Stunden lang aktiv, bei 100°C wird es nach 10 Minuten inaktiviert.

Es konnte in lyophilisierter Form mindestens sechs Jahre aufbewahrt werden.

Diese chemische Charakterisierung aus dem Jahre 1972 repräsentiert zweifellos einen relativ fortgeschrittenen Stand. Die normalerweise benutzten Extrakte weisen jedoch, obwohl 2000-fach konzentriert, einen relativ hohen Grad von Verunreinigung mit Hydroxyprolin auf, was auf eine Kontaminierung mit Kollagenphragmenten aus der Dermis hindeutet [116 und 161].

Bei Alkohol-Fraktionierung befindet sich die Hauptaktivität in der 70-80 %igen Fraktion [159].

Aber auch für die 0-60 %ige Fraktion können noch beachtliche Wirkungen nachgewiesen werden [277].

Merkwürdigerweise stimulierte die 80-90 %ige Fraktion die DNS-Synthese sogar, daß diese Phänomen als "chalone stimulatory effect" bezeichnet wurde.

3.1.3. Vorkommen des Epidermalen Chalons

Entsprechend der Tatsache, daß entwicklungsgeschichtlich die Epidermis des äußeren Integuments ihren Ursprung mit ganz verschiedenen Geweben gemein hat, wurde auch für diese Gewebe eine Kontrolle durch Epidermales Chalon vermutet.

In so verschiedenen Geweben wie Kaninchen- und Mäuselinse [262, 263a, 263b], Schweinegaumen und -zahnfleisch sowie menschlichem Zahnfleisch [159], Schweineösoophagus [162] und Lunge [47] sowie auch menschlichem Urin [47] konnte Epidermales Chalon nachgewiesen werden.

Außerdem ist es isoliert worden aus drei verschiedenen Tumoren epithelialen Ursprungs [41, 158, 173] und aus Lungentumoren der Maus und des Menschen [47]. Es erwies sich ebenso wirksam auf menschliche Epidermis [136], Kardia [94] und HeLa-Zellen [138].

3.1.4. Gewebsspezifität des Epidermalen Chalons

1. IVERSEN, ELGJO und HENNINGS verglichen zum Nachweis der Ge-

weebsspezifität die Wirkung des Hautextraktes mit der eines Leberextraktes. Dabei konnten sie regelmäßig [135, 138 u. 84] eine hochspezifische Wirkung des Hautextraktes feststellen.

2. FRANKFURT [94] vergleicht die Mitoseaktivität an der Kardia mit der des Dünndarms: Nur die Kardia steht unter der Herrschaft des Epidermalen Chalons.
3. Bei Verwendung von talgdrüsenfreier Epidermis zur Extraktgewinnung - z.B. Mundschleimhaut oder Dorschhaut [39], Ösophagus oder Lunge [47]- ergibt sich eine selektive Wirkung auf das interfollikuläre Hautgewebe. Offensichtlich haben die Talgdrüsen, obwohl entwicklungsgeschichtlich der Epidermis entstammend, ein eigenes Chalonsystem entwickelt. Zur Zeit ist es zwar technisch nicht möglich, Talgdrüsenchalon isoliert herzustellen, aber durch die Kenntnis seiner Existenz ist eine sehr elegante Möglichkeit, die Gewebsspezifität und Reinheit eines Epidermisextraktes nachzuweisen, möglich geworden:

Hochgereinigter Epidermisextrakt soll nur die Epidermiszellen, nicht aber die Zellen der Talgdrüsen hemmen. Ausgenutzt wurde diese Möglichkeit bisher zweimal [41, 159].

Die Herleitung des Talgdrüsenchalons durch BULLOUGH und LAURENCE 1970 [39] ist so überzeugend, daß sie bisher nicht kritisiert wurde.

Aus ähnlichen Gründen muß auch die Existenz eines eigenen Chalons der ekkrinen Schweißdrüsen vermutet werden.

3.1.5. Reversibilität der Wirkung

Es ergaben sich keine Zeichen von Toxizität nach vier aufeinanderfolgenden Injektionen [94].

3.1.6. Lageabhängigkeit des Epidermalen Chalons

Nicht nur die Epidermis, sondern auch eine Anzahl durchaus heterogener Gewebe (Kardia, Linse, Ösophagus, Zunge) sind von Epidermischalon beeinflussbar; es erhebt sich nun die Frage, ob sie in gleicher Weise und in gleichem Ausmaß auf die Chalonapplikation reagieren.

Zu diesem Problem führte EB. LAURENCE zusammen mit E. RANDERS HANSEN zwei Arbeiten durch, die das Problem teilweise klären.

Die folgende Tabelle demonstriert, wie unterschiedlich die Architektur und Kinetik von Zungenepithel und dem Epithel der Ohrmuschel ist.

Comparison of tongue epithelium and ear epidermis [157]

	Tongue epithelium	Ear epidermis
Total thickness of epithelium including Keratin layer	60-80	15-20
Number of cell layers in living epithelium	5-7	2-3
Thickness of Keratin layer	10-20	about 5
Number of cells/ 10 mm length basal layer	1691 $\pm$ 16	1476 $\pm$ 28
4 h colcemid mitotic in- dex		
CBA mice	102,6 $\pm$ 3,5	9,5 $\pm$ 0,42
C 57 Bl mice	132,0 $\pm$ 3,1	10,2 $\pm$ 0,23
Calculated mitotic inhi- bition		
CBA mice	1,2 h	4,2 h
C 57 Bl mice	1,2 h	3,1 h

Mit "mitotic index" (Tabelle) ist hier die Anzahl der sichtbaren Mitosen gemeint, die nach Applikation von Colcemid während vier Stunden auflaufen.

Der hohe mitotische Index der Zunge könnte folgende Ursachen haben:

1. Ein Mangel an Chalon aufgrund einer Minderproduktion

2. Ein Mangel an Chalon aufgrund eines Verlustes durch die Zellmembran
3. Direkte Inaktivierung des Chalons durch einen Chalonantagonisten.

Danach würde man am Zungenepithel eine stärkere Reaktion auf Chalongabe erwarten als beim Ohrmuschelepithel.

Die Resultate waren genau entgegengesetzt; die größte Mitosehemmung fand man am Ohrepithel mit 53 % im Vergleich zum Zungenepithel mit 17 % [157].

Also: Je höher die Mitoserate und je dicker das Epithel, desto geringer die Wirkung des applizierten Chalons [157].

Weiterhin ergab sich, daß Ohrmuschelepithelien stärker auf aus der Haut gewonnenes Chalon reagierten [159], während Zungenepithel stärker auf Chalon aus Gaumenepithel reagierte: ein Hinweis auf entwicklungsgeschichtliche Verwandtschaften.

Während man an der interfollikulären Epidermis eine Senkung der Mitoserate um bis zu 70 % erzielen kann, gelingt dies an der Kardia nur bis zu einem Wert von 27 %. Umgekehrt ergibt sich mit Kardiaextrakten eine Senkung der Hautmitosen um 52 % [113].

Im Dünndarm ergibt sich in keinem Fall eine signifikante Reaktion auf Chalon der Epidermis [162].

LAURENCE berichtet, daß Ösophagusepithel nicht auf Epidermischalon reagiert [162]: dem entspricht, daß der Ösophagus nonepithelialen Ursprungs ist; das trifft allerdings auch auf die Kardia zu, die beeinflußt werden konnte 94 %. Hingegen sind Talg- und Schweißdrüsen, obwohl ursprünglich epithelial, auf Epidermales Chalon unempfindlich.

Bei der Ausbildung der Lageabhängigkeit scheint die Dermis eine besondere Rolle zu spielen. Die Bedeutung der Dermis ist besonders von BILLINGHAM und SILVERS [18 und 19] untersucht worden. Hautepidermis kann durch Verpflanzung auf eine andere Dermis in unverhorntes Schleimhautepithel verwandelt werden; sie kann aber auch die architektonischen und histologischen Eigenschaften der Fußsohlenepidermis annehmen, wenn sie nur auf die entsprechende Dermis verpflanzt wird. Eine Ausnahme macht bei dieser "freien Konvertierbarkeit" lediglich das Zungenepithel.

Insgesamt gesehen erweisen sich die anscheinend nicht immer gleichartig ablaufenden Reaktionen von Epidermalem Gewebe-extrakt auf Epidermalem Gewebe als eine besonders differenzierte Gewebsspezifität und sollte deshalb nicht als Gegen-, sonder als unterstützendes Element des Chalonkonzeptes aufgefaßt werden. Sie scheint allerdings exogen durch Mitwirkung der Dermis gesteuert zu werden.

3.2. Das Leberchalon

3.2.1. Vorbemerkung

Die Leber ist ein Organ, in dem normalerweise so gut wie keine Mitosen ablaufen; die Zellen befinden sich langfristig in G_1 , d.h., man kann sie als G_0 -Zellen einstufen. Nur in der Nähe der Portalfelder laufen einige Mitosen ab; der Zellzyklus hat dort für G_1 eine Dauer von neun Stunden, für S ebenfalls neun Stunden, und für G_2 und M von 3-4 Stunden [259]. Der Rest befindet sich wie gesagt in der G_0 -Phase. Es wäre also zu erwarten, daß das Leberchalon in der G_2 -Phase wirkt.

Genaueren Aufschluß darüber kann man bekommen, wenn eine subtotale Hepatektomie (70 %) durchgeführt wird. Dann wechseln die Hepatozyten von der G_0 -Phase zur S-Phase über, und zwar, wie VERLY es beschreibt, in einer Welle, die sich vom Läppchenrand zum Zentrum bewegt [259]; 24 Stunden nach der subtotalen Hepatektomie haben 30 % der Zellen die DNS-Synthese aufgenommen. Dieser Wert fällt dann schnell wieder ab und wird etwa 4-5 Stunden später von einer Mitosewelle gefolgt, die ebenfalls von der Läppchenperipherie ausgeht. Die Leber benötigt ungefähr eine Woche zur vollständigen Regeneration; durch Markierung kann gezeigt werden, daß 95 % der Hepatozyten an der Regeneration teilnehmen.

Das Leberchalon wirkt aber auch auf die G_2 -Phase [62, 230, 240 und 259]. Es gibt sogar Anzeichen für eine Wirkung auf die S-Phase, denn bei genügender Chalongabe kann man eine sofortige Wirkung auf die DNS-Synthese konstatieren. LLANOS [165] fand bei in vivo Versuchen überhaupt keine G_2 -Wirkung; die ersten Effekte ließen sich nach 5-8 Stunden messen, eine ausgeprägte Hemmung nach 12 Stunden.

3.2.2. Speziesunspezifität

Die Speziesunspezifität des Leberchalons wurde bereits im Kapitel 2.3.1. erwähnt.

3.2.3. Gewebsspezifität

Von SAETREN war ein Leberextrakt als hochspezifisch geschildert worden [230]; auch VOLM et al. bestätigten zunächst die Gewebsspezifität [264]. Zwar erwiesen sich die Leberextrakte als recht unspezifisch, da sie auch andere Gewebskulturen hemmen konnten. Nach Einwirkung von DENA, eine Carcinogen, nahm die Wirkung aber selektiv für Leberzellen ab. Hieraus mußte geschlossen werden, daß das Chalon durch das Carcinogen zerstört oder gebunden worden war, nachdem es zuvor im Extrakt unter anderen Hemmsubstanzen "maskiert" war. Ähnliche Ergebnisse wurden von TERAYAMA und SASADA [254], allerdings für Asziteszellen, erzielt. VERLY konstatierte 1971 Gewebsspezifität für das Leberchalon; nicht signifikante Hemmwirkungen auf Niere und Milz waren aber auch hier zu verzeichnen gewesen [258]. Durch Verwendung einer Diaflowmembran UM 2 (Porengröße 1,2 µm) und fraktionierte Äthanolpräzipitation wurde ein insgesamt 45facher Reinigungsfaktor erzielt.

3.2.4. Charakterisierung

WG. VERLY konnte im Jahre 1972 auf dem Chalonkongreß neue Ergebnisse seiner Bemühungen um eine bessere Reinigung des Leberchalons vorlegen. Durch weitere Chromatographie des Extraktes wurde ein hochgereinigtes Ultrafiltrat gewonnen, dessen Aktivität auch nach Hitzeeinwirkung von 100°C unverändert bleibt [259]. In früheren Fällen war die Aktivität regelmäßig bei 70°C zerstört worden. die Chalone wurden dabei - so VERLY's Vermutung - mit anderen Proteinen kopräzipitiert. Proteolytische Enzyme (Trypsin und Pronase) zerstören die Aktivität des Leberchalons; Neuraminidase bleibt wirkungslos. Daraus ergibt sich, daß es sich beim Leberchalon um ein Polypeptid mit einem MG unter 1000 handeln muß. Mit dem Ultrafiltrat VERLY's konnte der Inhibitionsfaktor (Kontroll-Assay/Assay) für Milz und Niere ganz entscheidend gesenkt werden: "Damit ist der Faktor qualifiziert für die Bezeichnung Chalon gemäß der

Definition BULLOUGH's" [259].

Ungeachtet dieser Ergebnisse wurden am Heidelberger Krebsforschungszentrum Versuche mit einem ungereinigten Extrakt durchgeführt ("with the aim of testing rigorously tissue specificity" [266]) und die zu erwartende Verwirrung angerichtet: Die Leberextrakte zeigten auch auf Niere und Lunge Wirkung, auf die Niere war die Wirkung sogar noch stärker als auf die Leber [266]. Diese, im Grunde altbekannten Tatsachen wurden im Jahre 1973 in einer Flut von Veröffentlichungen in die Zeitschriften gebracht; dieselben Autoren (VOLLM), die noch 1968 gewebespezifische Hemmsubstanzen in der Leber entdeckt hatten und auch damals schon gewisse Nebeneffekte auf andere Gewebe bemerkt hatten, ohne die Gewebsspezifität prinzipiell in Zweifel zu ziehen, machten nun eine Kehrtwendung, obwohl im Grunde nichts Neues sich ereignet hatte; auch SPIELHOFF [174] hatte 1971 noch einmal mit einem wenig gut gereinigten Leberchalon Wirkungsüberschneidungen mit anderen Geweben festgestellt.

Im einzelnen waren die Artikel so überschrieben:

1. Failure to find "Hepatic Chalone" in Adult Rat Liver [273]
2. Non-Existence of Tissue Specific Growth Inhibitors in the Liver-Supernatant [266]
3. Elimination by the Carcinogen Diethylnitrosamine of Non-Specific Inhibitory Factors in the Regenerating Liver [272]
4. Fehlende Bedeutung gewebespezifischer Hemmsubstanzen ("Chalone") auf die Wachstumsregulation der teilhepatektomierten Leber.

Weitere Publikationen werden angekündigt.

Die Gewebsspezifität des Leberchalons wurde von VERLY zusammen mit A. SIMNARD daraufhin noch einmal bestätigt [84] : auf intestinale Mikrovilli und Zungenepithel konnte keine Wirkung festgestellt werden.

Auch RA. MENZIES bestätigte für embryonale Leber vom Hühnchen einen streng gewebespezifischen Effekt; der Extrakt stammte von älteren Ratten, als Kontrollgewebe diente Epithel der Darmschleimhaut und Alveolarepithel. Kontrollexperimente mit anderen Gewebsextraktquellen wurden ebenfalls gemacht; Ratten-

niere, Lunge und Herz hatten wenig oder keine Auswirkung auf Lebermitosen [184] .

3.2.5. Stresshormone

Der discriminative test war beim Leberchalon positiv; die Chalonwirkung konnte mit seiner Hilfe wieder aufgefrischt werden [259] . Auf der anderen Seite ist bekannt, wie bereits erwähnt, daß Hydrocortison und Adrenalin per se die Leberregeneration behindern können [259] .

Die Adrenalinabhängigkeit des Leberchalons wurde auch von CHOPRA und SIMNETT [62 u. 60b] mehrfach bestätigt.

3.3. Das Endometriumchalon

Die Frage, ob im Endometrium gewebespezifische Hemmsubstanzen zu finden sind, muß offen bleiben. Es gibt zustimmende [115] und ablehnende [265] Ansichten.

3.4. Das Granulozytenchalon

3.4.1. Chemische Charakterisierung

Das Granulozytenchalon wurde zuerst von RYTÖMÄA im Jahre 1968 teilweise charakterisiert [221] ; Säulenchromatographie legte ein MG von ungefähr 4000 nahe.

Es handelt sich um ein G_1 -Chalon; ob auch eine G_2 -Wirkung vorliegt, wurde nicht überprüft.

Das Verdienst einer sehr genauen Weiterentwicklung der Charakterisierung kommt WR. PAUKOVITS (Institut für Krebsforschung der Universität Wien) zu [201, 202, 204 u. 205] .

Es scheint sich um ein Polypeptid mit einem MG von unter 5000 zu handeln [201 u. 204] ; die Substanz ist in der Lage, die Gesamt-DNA-Produktion des Knochenmarks um 20 % herabzumindern [201] ; das Polypeptid ist hydrophil [202] und die Kettenlänge beträgt zwischen 20 und 30 Aminosäuren. Seine Aktivität verschwindet bei Einwirkung von Proteasen [204] . Der Faktor ist hochspezifisch.

Der bisher aufwendigste und intensivste Versuch PAUKOVITS', das Granulozytenchalon zu charakterisieren, ergab nach Elektrophorese und Dünnschichtchromatographie 3-4 ninhydrinpositive

Flecken, deren Aminosäurezusammensetzung eine "normale" Verteilung zeigte. Unter ihnen muß das Granulozytenchalon zu suchen sein [205].

3.4.2. Speziesunspezifität

Das Granulozytenchalon zeigt keine Speziesspezifität [201].

3.4.3. Gewebsspezifität

Die Frage der Gewebsspezifität der Blutzellen ist von besonderer Bedeutung, weil sie sich im Knochenmark auswirkt, wo drei verschiedene Zellreihen mit einer Serie von verschiedenen differenzierten Vorläuferzellen und deren Stammzellen miteinander vermischt sind.

RYTÖMAA [227] unterscheidet drei verschiedene Methoden des Nachweises der Gewebsspezifität beim Granulozytenchalon.

1. Die "einfache" Radionuklidmethode arbeitet mit Kurzzeit - in vitro - Kulturen, wie sie von RYTÖMAA [221, 226 u. 323] benützt wurden. Dabei ergab sich eine signifikante Hemmung der weißen Reihe ohne Beeinträchtigung anderer Zelltypen des Knochenmarks.
2. PAUKOWITS [205] trennte durch physikalische Methoden, nämlich der "ficoll density step centrifugation" von EVANS [90] - die Zellen der weißen Reihe, um im einzelnen das Wirkmuster des Granulozytenchalon zu ergründen. Dadurch wurde zunächst eine gute Anreicherung der myeloischen Vorläuferzellen erzielt und eine gute Trennung von anderen Zellen. Durch die nachfolgende "velocity sedimentation" [187] konnte eine Unterfraktionierung in Promyelozyten, Myeloblasten und Myelozyten erreicht werden. Die erhaltenen Vorläuferzellen machten 80 % des Zellkonzentrates aus. Es stellte sich heraus, daß Granulozytenchalon die Proliferation aller mitotisch aktiven Vorläuferzellen der weißen Reihe im Knochenmark, möglicherweise sogar die Gruppe der committed stem cells, hemmt [205].
3. Die ersten beiden Methoden lassen sich im Prinzip nur als in vitro Methoden verwenden.
SCHÜTT und LANGEN (1972) [234] gingen einen interessanten

Weg im in vivo Versuch:

Knochenmarkszellen wurden mit 3H-Thymidin markiert und eine Entzündungsreaktion in der Peritonealhöhle der Versuchsratten induziert, also ein Proliferationsreiz für das Knochenmark. Chaloninjektionen konnten die reaktive DNA-Synthese deutlich (bis zu 50 %) herabsetzen.

4. BENESTAD führte 1970 ein sehr geschicktes in vivo Testsystem ein [10]. In die Bauchhöhle implantierte Diffusionskammern, die mit Zellen befrachtet werden können, dienen als Testsystem. Ihre 0,22 m großen Poren sind für Zellen nicht, wohl aber für Substanzen wie das Granulozytenchalon durchlässig.

Die Kammern wurden mit Knochenmarkszellen bzw. mit Makrophagen und Immunoblasten befrachtet.

Das Granulozytenchalon erwies sich dabei als streng gewebspezifisch [10].

Nur nach großen Chalondosen wurde auch die Makrophagenproliferation mit betroffen. Dies mag auf einen unspezifischen Effekt hindeuten; es sollte jedoch bedacht werden, daß auch ein Makrophagenchalon existieren könnte, mit dem der Extrakt verunreinigt ist [9 und 21]. Dieses Makrophagenchalon könnte besonders deshalb eine Rolle gespielt haben, weil 30-40 % der zur Chalongewinnung benutzten Zellen Makrophagen waren [10].

Die von RYTÖMAA publizierten Hemmwerte betrugen 25-40 %. LAJTHA, der die Experimente wiederholte [154], kam sogar auf eine gemessene Proliferationsdepression von 50-60 %; diese Werte sind jedoch nicht erklärlich, wenn das Chalon nur den Übergang G₁ nach S beherrscht, meint LAJTHA [154].

Alle Messwerte über 20-30 % machen auch eine Wirkung auf die S-Phase selbst wahrscheinlich; Werte über 50 % können nur erreicht werden, wenn die DNS-Synthese in der roten Reihe mit betroffen sind. Zur Klarstellung empfiehlt LAJTHA Kontrolllexperimente mit anämischen oder polyglobulen Tieren.

3.4.4. Reversibilität

Zytotoxische Zeichen wurden nicht gefunden.

Zellvermittelte Immunreaktionen können im Fall der Diffusions-

kammerexperimente wegen der Größe der Kammerporen ausgeschlossen werden.

3.5. Erythrozytenchalon

3.5.1. Chemische Charakterisierung

KIVILAAKSO und RYTÖMÄ [146] konnten demonstrieren, daß aus polyzytämischen Ratten gewonnenes Serum einen hemmenden Einfluß auf die Proliferation in normalen Knochenmarkszellen, verglichen mit normalem Serum, ausübt. Der Effekt wurde einem möglichen Erythrozytenchalon zugeschrieben. Die beiden Autoren nahmen daraufhin die Isolierung des Erythrozytenchalons in Angriff; fast gleichzeitig mit ihnen glückte auch R. SEIP [235] und R. LINDEMANN [164b] die Isolierung eines Erythropoiesis Inhibiting Factor, von dem PAUKOVITS [205] meint, er könne identisch mit dem vermuteten Chalon sein.

Das Erythrozytenchalon wird mit derselben Fraktion eluiert wie das Granulozytenchalon, was ein Molekulargewicht zwischen 2000 und 4000 erwarten läßt.

Die Funktion des Erythrozytenchalons scheint darin zu suchen zu sein, die Erythrozytenvorläuferzellen von exzessiver Proliferation zurückzuhalten. Allem Anschein nach hat es keine Wirkung auf die DNS-Syntheserate; möglicherweise hat es eher eine Reifungsfunktion, aus der dann sekundär eine Mitosehemmung resultiert.

3.5.2. Gewebsspezifität

Erythrozytenextrakt hat auf Granulozyten keine Hemmwirkung [147] .

3.5.3. Reversibilität

Es wurden eingehende Zytotoxitätsprüfungen durchgeführt, weil die Fraktion 4 der insgesamt 15 Gelfiltrationsfraktionen offensichtlich einen zytotoxischen Effekt hatte. Fraktion 9 und Fraktion 10 (die Chalonfraktionen) waren davon nicht betroffen [147] .

3.6. Lymphocytenchalon

3.6.1. Chemische Charakterisierung

Die erste Anwendung des Chalonkonzepts auf die Lymphocyten

geht in das Jahr 1969 zurück [192]. Die Extrakte entstammen einem sekundären lymphatischen Organ (Lymphknoten vom Schwein), und waren imstande, die Aufnahme von ^3H -markiertem Thymidin in normalen Lymphozyten [119 und 192] sowie in leukämischen Lymphozyten zu hemmen [192]. Auch aus menschlichen Lymphozyten konnten wirksame Extrakte erhalten werden [156]. RNA- und Proteinsynthese waren nicht betroffen; die aktive Komponente schien ein Protein mit einem MG von 45000 zu sein. HOUCK charakterisierte die Wirksubstanz als thermolabilen und trypsinempfindlichen Faktor mit einem MG von 30000 bis 50000 [118]; es war auch aus Milz, Lymphknoten und Thymus von Schwein, Kuh und Ratte isolierbar [118 und 119 sowie 124]. Der isoelektrische Punkt soll zwischen 4 und 5 liegen [96]. Auch in vivo konnte das Lymphozytenchalon die Zahl der immun-kompetenten Zellen in der Milz von Mäusen, die zuvor gegen Schafserythrozyten sensibilisiert worden waren, herabsetzen. Zum Spektrum der Fähigkeiten des Lymphozytenchalons gehört auch die Beherrschung der graft versus host Reaktion [96, 179 und 180]. Es zeigte sich dabei im einzelnen [96], daß

- 1. die Lymphozyten der behandelten Mäuse nicht fähig sind, Blastencharakter anzunehmen,
2. die Lymphozyten nicht mehr in der Lage sind, eine Antikörperreaktion gegen Schafserythrozyten aufzubauen,
3. die Lymphozyten nicht mehr in der Lage sind, nach Ganzbestrahlung der Wirtstiere in diesen eine GVH-Reaktion auszulösen.

Wahrscheinlich ist das Lymphozytenchalon auf der Oberfläche der Zelle lokalisiert; es ist eine interessante Tatsache, daß das Chalon von der leukämischen Zelloberfläche durch Spülen sehr leicht entfernt werden kann.

3.6.2. Speziesunspezifität

Gleich aus welcher Spezies der Extrakt gewonnen wird (Ratte, Kalb, Schwein), ergeben sich signifikante Hemmwerte für die Aufnahme von markierten DNS-Bausteinen, sowohl in normalen wie in leukämischen Leukozyten [124].

3.6.3. Gewebsspezifität

Alle benutzten lymphatischen Gewebsextrakte (Leber, Milz, Lymphknoten, Thymus), gleich, ob primäres oder sekundäres lymphatisches Gewebe, erwiesen sich als wirksam auf normalen und lymphatisch-leukämischen Lymphozyten. Leber, Muskel, Gehirn, Niere, Fibroblasten reagierten hingegen nicht. Diploide menschliche Fibroblasten oder HeLa-Zellen reagieren auf Milz- und Thymusextrakte nicht [118]; die roten, weißen und plättchenbildenden Blutzellreihen zeigten ebenfalls keine Reaktion [96]. Der Wirkungsbereich des lymphatischen Chalons bezieht sich jedoch nicht auf die hämopoetischen Stammzellen; darunter werden diejenigen Zellen verstanden, die imstande sind, in der Milz von lethal und sublethal bestrahlten Tieren um sich herum Kolonien zu bilden.

3.6.4. Reversibilität

Da die blutbildenden Stammzellen nach Chaloneinwirkung noch vermehrungsfähig sind, entfallen zytotoxische Momente von vornherein. Das Lymphozytenchalon verursachte keine toxischen Reaktionen oder Intoleranzerscheinungen [179].

Rohe Extrakte dagegen sind nicht immer frei von zytotoxischen Verunreinigungen [67].

3.6.5. Verschiedenes

Als Rohmaterial für Lymphozytenchalon wird die Benutzung von getrockneter, entfetteter Milz empfohlen: die gewonnene Chalonkonzentration ist dann von Anfang an weit aus höher, da frische Milz zu 80 % aus Wasser und Fett besteht [124].

Die Überlebenszeit von xenotransplantierten Tieren konnte unter Therapie mit Lymphozytenchalon signifikant verlängert werden [67].

3.7. Thymuschalon

3.7.1. Vorbemerkung

KIGER, FLORENTIN und MATHE berichten von der Isolierung eines Thymuschalons [92 und 145], das sich von anderen aus dem Thymus gewonnen Substanzen (Histone [145] und α_2 -Glycoprotein [55])

offensichtlich unterscheidet, da es sich um ein saures Protein handelt.

3.7.2. Speziesunspezifität

Extrakte aus Kalbsthymus und Schafsthymus sind bei Maus und Ratte wirksam [145].

3.7.3. Gewebsspezifität

Bei allen Immunreaktionen, die ganz oder teilweise von T-Lymphozyten unterhalten werden, gelang es, die Wirkung des Extraktes nachzuweisen: PHA-stimulierte Lymphozytentransformation zu Blasten, GVH-Reaktion und Transplantatabstoßungen [145].

3.8. Nierenchalon

3.8.1. Vorbemerkung

Obwohl schon sehr früh gewebsspezifische Hemmfaktoren aus der Nieren isoliert werden konnten [230], ist die Beschäftigung mit dem Nierenchalon bis heute nicht sehr weit gediehen. Hinweise für die Existenz gewebsspezifischer Hemmfaktoren der Niere sind zwar schon früher hin und wieder gefunden worden [60 und 103], die chemische Natur des Stoffes ist jedoch ganz und gar unaufgeklärt.

3.8.2. Gewebsspezifität

Die Nierenextrakte senkten die Mitoserate um 53 %; auf Leber und Lunge hatte das Nierenchalon keine Auswirkung. Auch die Speziesunspezifität und Reversibilität waren gewährleistet.

3.8.3. Stresshormone

Adrenalin oder Hydrocortison zeigten isoliert keine Wirkung. Erstaunlicherweise hatten Adrenalin und Hydrocortison jedoch, in Kombination gegeben, eine beachtliche Wirkung. Die Kombination der Nierenextrakte mit den Stresshormonen ergab eine Steigerung der Mitosehemmung bis auf 90 %. Dieser Wert läßt sich bei separater Anwendung von Stresshormonen bzw. Nierenextrakt nur durch 5fache Steigerung der Menge des Nierenex-

traktes bzw. 10fache Steigerung der Konzentration der Stresshormone erreichen, sodaß hier offensichtlich so etwas wie eine Potenzierung der Wirkung eintritt.

3.8.4. Weitere Aspekte

Die Wirkung der Extrakte tritt innerhalb der ersten vier Stunden ein, was eine G_2 -Wirkung nahelegt.

Die Existenz von chalonartigen Hemmsubstanzen bereits in der embryonalen Vorniere konnte auf indirektem Wege gezeigt werden: Als Chalon sollte die Hemmsubstanz Peptid-oder Glykoproteincharakter, also Antigencharakter haben. Nach Gabe eines gegen das Chalon gerichteten Antiserums konnte die Mitoserate bis zu 30 % gesteigert werden, ein Zeichen für die Ausschaltung proteinartiger Hemmsubstanzen der Vorniere [60b und 62] .

3.9. Das Melanozytenchalon

3.9.1. Chemische Charakterisierung

GIACOMETTI und ALLEGRA [97] vermuteten zuerst, daß die Melanozyten von einer gesonderten Wachstumskontrolle regiert würden: Nach Hautverletzung verläuft die Melanozytenregeneration anders als die der übrigen epidermalen Zellen.

BULLOUGH und LAURENCE fiel auf, daß ungereinigte Hautextrakte auch die Mitoserate von Melanomzellen herabsetzen konnten, ein Vorgang der bei hochgereinigtem Epidermalem Chalon verschwand. Die vorläufige Charakterisierung des Melanozytenchalons durch DEWEY ergab folgende Eigenschaften [77]:

Es ist dialysierbar wie das Granulozytenchalon. Dies deutet auf ein niedriges MG hin. Durch Fraktionierung wurde ein MG von unter 2000 ermittelt.

Trypsin hatte keine Wirkung auf die Substanz, wenn es nicht mindestens eine Stunde bei 37°C damit inkubiert wurde. Ähnliches gilt für Chymotrypsin. Auch Neuraminidase [77] kann den Extrakt inaktivieren. Bei Erhitzung auf Temperaturen über 50°C wird die Substanz sofort inaktiviert.

3.9.2. Gewebsspezifität

Melanozytenchalon hatte keine Wirkung auf kultivierte Alveolar-

zellen des Chinesischen Hamsters, auf kultivierte menschliche Leberzellen vom Embryo und auf normale menschliche Fibroblasten [77] .

3.9.3. Reversibilität

Große Dosen waren in einzelnen Fällen letal, wahrscheinlich wegen toxischer Elemente im Extrakt [189] .

3.9.4. Streßhormone

Streßhormone sind nicht erforderlich [77] .

3.9.5. Weitere Aspekte

1. Grobgereinigter Melanomextrakt konnte eine exzessive Pigmentproduktion induzieren; diese Eigenschaft konnte durch Erhitzen auf 50 Grad vernichtet werden; auch durch Dialysieren konnte dieser Faktor, der für Tyrosinase gehalten wurde, nicht abgetrennt werden [77] .
2. Therapeutisch könnte ein spezifischer Hemmextrakt gegen Melanome und ihre Metastasen exzessiv eingesetzt werden, da Melanozyten nicht lebensnotwendig sind. Melanome machen 1 % aller Karzinome aus. Man hat versucht, die pigmentbildenden Eigenschaften dieser Zellen so einzusetzen, daß sie ihre eigene Zerstörung induzieren. 4-Hydroxyanisole wird von der in Melanozyten enthaltenen Tyrosinase oxidiert, wodurch toxische Radikale freigesetzt werden. In Zellkulturen war diese Methode sehr erfolgreich und selektiv [210] , nicht dagegen in ersten klinischen Versuchen [211] .

3.10. Das Fibroblastenchalon

3.10.1. Chemische Charakterisierung

Schon mit geringen Extraktmengen läßt sich eine beachtliche Mitosedepression (bis 73 %) der ³H-Thymidin-Inkorporation erreichen [120 u. 125] .

Der isoelektrische Punkt der zugrundeliegenden Substanz (Fibroblastenchalon) liegt zwischen 3,5 und 4,3 [125] ; das Molekulargewicht liegt zwischen 30000 und 50000.

Die mitosehemmende Aktivität konnte durch Trypsinandauung zer-

stört werden; die Substanz ist thermolabil.

3.10.2. Gewebsspezifität

Die Extrakte hatten keinen Effekt auf den ^3H -Thymidin-Einbau bei diploiden menschlichen Lymphozyten nach Stimulation durch PHA, ebenso wie auf HeLa-Zellkulturen [15].

3.10.3. Reversibilität

Durch Spülen der Fibroblasten mit MEM (Eagle's minimal essential medium), dem 10 % Serum zugesetzt sind, gelingt es, die Hemmwirkung zum Verschwinden zu bringen, wenn die Extraktkonzentration 2 mg/l nicht übersteigt. Bei höheren Konzentrationen kommen zytotoxische Elemente zum Tragen, denn nur 2/3 der Hemmwirkung kann durch MEM entfernt werden [15].

3.10.4. Weitere Aspekte

Offensichtlich konkurriert das Fibroblastenchalon mit einem Serumantagonisten um die Rezeptoren der Zelloberfläche. Mischungen von Extrakten unterschiedlicher Chalon- und Serumanteile deuten dies an: Je höher der Serumanteil ist, um so mehr Chalon muß begefügt werden, wenn die Hemmwirkung gleichbleiben soll. 126 .. Das verantwortliche Mitogen ist ein Sialoprotein mit einem Molekulargewicht von 120000 und einem isoelektrischen Punkt von 5,2 - 5,4 ; es konnte vom Kalbsfetus, vom Rind, Pferd und Mensch isoliert werden [120 und 122].

3.11. Das Talgdrüsenchalon

Die Existenz des Talgdrüsenchalons, wie auch seine Gewebsspezifität und die Speziesunspezifität ist bereits in Kapitel 3.1.4. nahegelegt worden [24].

3.12. Das Spermatogonienchalon

3.12.1. Nachweis der Existenz

Das Spermatogonienchalon ist das (neben dem Thymuschalon) zuletzt gefundene Chalon [69 u. 70]. Es handelt sich um das Chalon der Spermatogonien vom Typ A_0 ; das sind Zellen, die sich normalerweise in der G_0 -Phase befinden. Zur prolifera-

tiven Zellgruppe gehören im Normalfall nur die Spermatogonien vom Typ $A_1 - A_4$ [56]. Offensichtlich sind die A_0 -Zellen vor schädlichen Noxen besser geschützt, denn nach Röntgenbestrahlung verschwanden die proliferativen Stammzellen der Gruppe $A_1 - A_4$ aus den Tubuli, während die A_0 -Zellen nicht betroffen waren. Sie gehen nur dann zur Proliferation über, wie sich aus den gemessenen Werten der ^3H -Thymidin-Inkorporation zeigte, wenn ein größerer Zellverlust ausgeglichen werden muß [69, 70 u. 82]. Durch das Spermatozytenchalon können die A_0 -Zellen an der Proliferation gehindert werden [69, 70 u. 82].

3.12.2. Gewebsspezifität

Leberextrakt hatte keine Wirkung auf den Markierungsindex bestrahlter Hoden; umgekehrt zeigten STICH und FLORIAN schon 1959, daß Hodenextrakt auf die Leber keine Wirkung hat. Die spezifische Wirkung auf die A_0 -Spermatogonien bedeutet, wie CLERMONT [97] schreibt, im übrigen nicht nur eine gewebsspezifische, sondern eine zellspezifische Wirkung.

3.12.3. Speziesunspezifität

Wurde nicht geprüft.

3.12.4. Reversibilität

Aufgrund der selektiven Wirkung müssen zytotoxische Effekte ausgeschlossen werden. Die Reversibilität konnte wegen der Dauer des Experimentes (nur 24 Stunden) nicht schlüssig nachgewiesen werden.

3.13. Lungenchalon

3.13.1. Chemische Charakterisierung

Eine genauere chemische Charakterisierung liegt nicht vor.

3.13.2. Gewebsspezifität

Leberextrakt war ohne Wirkung auf die Lunge [243].

3.13.3. Speziesunspezifität

Lungenextrakte von Maus und Ratte waren in gleicher Weise wirksam.

3.13.4. Streßhormone

Adrenalin ist proportional seiner Konzentration auf Lungengewebe in vitro wirksam [243]. Dies soll - nach SIMNETT - auf noch vorhandenen Chalonspuren im Gewebe - im Sinne des Zustandekommens eines Chalonadrenalinkomplexes - zurückzuführen sein. Der Chalonextrakt selber ist auch ohne Adrenalinzusatz wirksam. SIMNETT meint daher - wiederum getreu der Theorie vom Chalonadrenalinkomplex -, daß sich im Extrakt noch Adrenalin Spuren befinden müßten.

3.13.5. Weitere Aspekte

Die Existenz eines Lungenchalons ist insofern interessant, als die Lunge ein Organ mit einem schnellen physiologischen Zellwechsel ist [242], zur Regeneration aber nicht befähigt ist. Ausnahmen machen hier nur noch nicht ausgewachsene Tiere, Ratte und Amphibien. Daraus kann eventuell der Schluß zu ziehen sein, daß das Chalon generell bei der Zellregeneration (Be-griffsbildung nach Kapitel 1.2.) keine wesentliche Rolle spielt.

3.14. Das Linsenchalon

Muß dem Epidermalen Chalon zugeordnet werden (siehe dort).

3.15. Das Asziteschalon

3.15.1. Chemische Charakterisierung

Entsprechend der Tatsache, daß Aszitesflüssigkeit suspendierte Asziteszellen in der G_1 - wie in der G_2 -Phase zu hemmen vermag [120 u. 125], wurden nach Ultrafiltration zwischen verschiedene aktive Fraktionen gefunden:

Eine mit einem MG zwischen 1000 und 10000 mit Wirkung auf die G_2 -Phase,

eine mit einem MG zwischen 10000 und 50000 und mit G_1 -inhibitorischen Eigenschaften.

3.15.2. Speziesunspezifität

Entfällt durch die (Tumor-) Natur des Asziteschalons.

3.15.3. Gewebespezifität

- a) Ein fortgeschrittener Aszitestumor hemmt die Proliferation der myeloischen und erythropoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark nicht [155].
- b) Inparabiotischen Mäusen konnte das Regenerationswachstum ("recurrent growth") eines JB-1 ascites tumor völlig unterbunden werden, wenn das andere Tier einen Tumor derselben Art in der Plateauphase trug [14].
- c) Der Ehrlich-Aszites-Tumor wie auch der JB-1 Tumor erreichen ihr Wachstumsplateau bei einer Zellzahl von 1×10^9 Zellen. Bei gleichzeitiger Verimpfung der beiden verschiedenen Tumoren wurde die doppelte Zellzahl in der Aszitesflüssigkeit gemessen, nämlich eine Zellmenge von 2×10^9 bei völliger Durchmischung der Zellen; das bedeutet, daß jeder Tumor seine Wachstumsregulation unbeeinflußt vom anderen durchsetzt [16].
- d) Ähnliche Resultate wurden von BROWN [23] mitgeteilt, der einem Ehrlich-Aszites-Tumor gleichzeitig mit dem Crocker-Aszites-Sarcom 180 in dieselbe Maus inokulierte.

3.15.4. Reversibilität

LALA [155] berichtet, daß ein fortgeschrittener Aszitestumor die Proliferation der myeloischen und erythropoetischen Vorläuferzellen nicht hemmt (wie bereits in Kapitel 3.15.3. erwähnt).

DE COSSE und GELFANT [75] zeigten in ihren Versuchen die Mitwirkung einer immunologischen Komponente für den Block in G_2 , da dieser durch Behandlungen mit Immunosuppressiva beseitigt werden konnte.

Das niedrige MG des Asziteschalons und die Fähigkeit zur Blockung in zwei verschiedenen Zellphasen (G_1 und G_2) machen chalonin-duzierte Immunmechanismen jedoch unwahrscheinlich; die Mitteilungen von DE COSSE und GELFANT müssen deshalb einstweilen als ein Sonderfall angesehen werden.

Bezüglich der Wirkung der Stresshormone siehe Kapitel 4.2.3.4.

4. Teil Der Wirkmechanismus der Chalone

4.1. Chalone- G_1 - oder G_2 -Inhibitoren ?

4.1.1. Vorbemerkung

Nicht ohne Grund wurde die Frage, in welcher Phase des Zellzyklus die Wirkung der Chalone ansetzt, erst relativ spät behandelt. Man hielt sie anscheinend für gelöst; stillschweigend wurde eine Wirkung in G_2 vorausgesetzt. Es gab dafür einen ganz einfachen Grund: Die Chalonwirkung wurde zunächst mittels eines Assays bestimmt, der lediglich Rückschlüsse auf die G_2 -Phase und den Mitosevorgang selbst zuließ. Dies war sicherlich ein Fehler, der den mit Chalonen arbeitenden Wissenschaftlern erst allmählich zum Bewußtsein kam, nachdem RYTÖMAA die Chalonwirkung mittels eines G_1 -Phasen-Assays bestimmte [221]. Langsam wurde damit begonnen, Material über die Funktion der verschiedenen Zellphasen und ihre Bedeutung aufzuarbeiten.

4.1.2. Die verschiedenen Zellphasen

Man mußte zur Kenntnis nehmen, daß zwar mehrere Abschnitte des Zellzyklus als "Ruhephase" (im Sinne einer größeren zeitlichen Ausdehnbarkeit) in Frage kommen [39]. Aber gerade die G_2 -Phase ist nach GOEDEKE in ihrer Dauer eine eher unvariable Phase im Zellzyklus [99]. Sie scheint also von diesem Gesichtspunkt aus für einen Ansatzpunkt der Wachstumsregulation weniger in Frage zu kommen. Ihre Dauer schwankt normalerweise zwischen 2 und 5 Stunden (in Tumorgeweben und Zellkulturen ist sie allerdings verlängert) [99].

Die G_1 -Phase weist in vitro und in vivo die größte Variabilität auf, sie kann sogar ausfallen [212] (dann muß der Schritt zur Initiierung der S-Phase schon im vorausgegangenen Zellzyklus abgelaufen sein). Die G_1 -Phase kann Wochen und Monate dauern; sie wird dann gern als G_0 -Phase bezeichnet.

Aus zahlreichen Inhibitionsversuchen mit Antibiotika hat sich ergeben, "daß während der G_1 -Phase spezifische RNA und Proteine gebildet werden, die nach einer bestimmten Akkumulation zur Initiation der DNS-Synthese führen" [99].

Ist die DNS-Synthese (S-Phase) einmal eingeleitet, laufen nach

ROBINS und SCHARFF eine Reihe biochemischer Prozesse ab, die zwangsläufig zur Zellteilung führen [212] (jedoch soll auch die S-Phase keine Alles- oder Nichts-Reaktion sein [112]). Einer der entscheidenden Regulationsfaktoren zur Initiierung der DNS-Synthese könnte die Thymidinkinase sein, die in der späten G_1 -Phase de novo synthetisiert wird und deren Anstieg parallel mit dem Aktivitätsprofil abläuft (die DNA-Polymerase-Aktivität scheint während aller Zellphasen konstant zu bleiben; damit scheint ihr für die Einleitung der S-Phase keine Bedeutung zuzukommen).

Die Ansicht, daß Chalonbehandlung eines Gewebes, insbesondere auch zum klassischen Untersuchungsgewebe der Epidermis, eine Applikation auf eine G_1 -Population bedeutet, weil sich die meisten Zellen in G_1 befinden, hat sich inzwischen durchgesetzt [277]. FRANKFURT [94], HOUCK [121], PRESCOTT [209], OLVEY [195], RYTÖMAA u. KIVINIEMI [221], HENNINGS, ELGJO u. IVERSEN [111], sowie HALL [106] und BASERGA [9] sind einmütig der Meinung, daß ein biologischer Wachstumsregulator in der G_1 -Phase angreifen müsse. BICHEL äußert daher: "It is ... the prevailing opinion that control of growth is usually a control of the initiation of DNA synthesis" [16].

Gemerell läßt sich für die G_1 -Phase sagen, daß sich hier die für ein Gewebe oder eine Zelllinie typischen Stoffwechselleistungen abspielen.

4.1.3. Das "Splitting" der Chalons: Wirkung in G_1

Man erinnerte sich nun auch, daß BULLOUGH schon 1965 angenommen hatte, daß der Block in der späten G_1 -Phase liegt [31]. Er nannte sie "Dichophase", weil die Zelle sich zu diesem Zeitpunkt entscheiden muß, ob sie den Weg zur Mitose oder zu einer längeren "Funktionsphase" einschlägt.

Um die Wirkung des Chalons auf die G_1 -Phase zu prüfen, muß eine andere Assay-Technik angewandt werden:

Eine Vorstellung über den Zelldurchfluß durch die G_1 -Phase oder seine Hemmung kann man erhalten, wenn man mit radioaktiv markiertem Thymidin die Menge der in die S-Phase eingetretenen Zellen mißt. Bei einem Block in der G_1 -Phase nimmt die S-Phasen-

Population ab mit dem meßbaren Resultat, daß die spezifische Stoffwechselaktivität der S-Phase gleichfalls abnimmt.

BADEN und SVIOLKA [6] benutzten 1968 diese Technik zur Beobachtung der Chalonwirkung an Rattenhaut in vitro. In einem über drei Stunden gehenden Versuch fanden sie keine Änderung des Thymidin-Stoffwechsels. Dies ist jedoch nach einem so kurzen Zeitraum auch nicht zu erwarten, sondern frühestens nach neun Stunden [111]. HALL jedenfalls [106] konnte am Epithel von Hamsterbackentaschen eine deutliche Wirkung demonstrieren; ähnliche Ergebnisse stammen von MARKS [174], DAHL und SHUSTER [74], DELESCLUE [76] und BORN [21b].

Injektion von Epidermischalon bewirkt also eine Zellinhibition in G_1 und G_2 ; in Ohrmuschelepidermis, aber auch an einem transplantablen Hamstertumor wurde eine Beeinflussung beider Phasen gefunden [84] (die Mitoserate wurde innerhalb der ersten vier Stunden um 35 % gesenkt (G_2 -Wirkung), die DNS-Synthese im Tumor nach 4-8 Stunden. Das schnelle Ansprechen der Tumorzellen wird auf die kürzeren Durchgangszeiten des Zellzyklus im Tumor zurückgeführt. Die Mitosendauer im Tumor beträgt 0,6 Stunden gegenüber normalen 0,9 Stunden [84]). Bei der Anwendung von Actinomycin D, einem RNA-Syntheseblocker, fielen ELGJO und HENNINGS ebenfalls ein "Splitting" des Epidermalen Chalons auf [86]. Äußerlich mit Epidermisextrakt behandelte Tiere wurden in bestimmten Zeitabständen gruppenweise getötet. Zuvor wurde auf die behandelten Hautstellen Actinomycin (100 μ g) aufgebracht.

Die Hautstellen dienten dann als Rohmaterial zur Gewinnung eines neuen Extraktes, dessen G_1 und G_2 inhibitorische Potenz anschließend geprüft wurde. Das Resultat war, daß diese Extrakte selektiv ihre G_2 -inhibitorische Wirkung verloren hatten.

Die G_1 -inhibitorische Wirkung läßt sich demgegenüber noch nach 24 Stunden feststellen; mit einer 40%igen Senkung der Syntheserate war sie sogar noch sehr deutlich.

Offensichtlich ist das G_1 -Chalon stabiler oder es wird von einer stabileren RNA synthetisiert, wie ELGJO [85] vermutet, während die G_2 -Komponente von einer RNA mit einer kurzen Halbwertszeit hergestellt wird.

Ein "Solitting" läßt sich auch nachweisen, wenn ein Carcinogen, z.B. Methylcholanthren, auf Mäuseepidermis aufgebracht wird [213].

In zwei grundlegenden Arbeiten gelang es ELGJO et al., die beiden Komponenten des Epidermalen Chalons bestimmten Schichten der Haut zuzuweisen [35 u. 37]. Er konnte dabei auf die von LAERUM [152] entwickelte Methode zurückgreifen: Nach Trypsinbehandlung von Hautstückchen lösen sich die differenzierten Zellen mitsamt der Hornschicht von der darunterliegenden Basalzellschicht. Diese kann dann leicht von der Dermis abgeschabt und in einer flüchtigen Lösung gepuffert werden. Auf diese Weise ist es möglich, ziemlich reine Basalzellextrakte und Extrakte der darüberliegenden differenzierten Zellschichten zu erhalten.

Die Anwendung der Extrakte ergab folgendes:

Die Basalzellen enthalten eine Substanz, die als G_2 -Chalon angesprochen werden kann, während die darüber befindlichen Zellschichten Epidermales G_1 -Chalon hergeben [85 u. 87].

Auch die Versuche an Aszitestumoren [16, 120 u. 125] ergaben eine Wirkung des Asziteschalons auf G_1 und G_2 -Phase. Die G_1 -Zellen wurden nach einmaliger Injektion für ca. 4 Stunden geblockt, diejenigen in G_2 für ca. 1 1/2 Stunden + 120 %. Nach der Blockade beginnen die G_2 -Zellen sofort mit der Mitoseeinführung [16]; da nach dem Ende der Blockade auch ein sofortiges Anwachsen der Menge der S-Phasen-Zellen erfolgt, muß auch eine Blockierung in G_1 vorgelegen haben.

Das Asziteschalon scheint damit aus zwei verschiedenen Substanzen zu bestehen.

Abschließend seien noch zwei Untersuchungen genannt; die deshalb aus dem Rahmen fallen, weil sie eine Hemmung sogar der S-Phase nahelegen: Und zwar fanden R. MARKS [174] wie auch CL. WILEY [277] schon während der ersten beiden Stunden nach Chalonapplikation eine Hemmung der DNS-Synthese.

4.1.4. Das Epidermale G_1 -Chalon

Die Charakterisierung des Epidermalen G_1 -Inhibitors, die sehr

weit vorangetrieben werden konnte, ist F. MARKS zu verdanken. Auf der Internationalen Chalonkonferenz in Genéve 1972 konnte er seine ersten Veröffentlichungen über den G_1 -Inhibitor [169 u. 168] durch die Ergebnisse äußerst detaillierter Untersuchungen ergänzen [173].

Obwohl der Inhibitor der DNS-Synthese sich im Prinzip mit dem der Mitose decken könnte, ist es wahrscheinlicher, daß es sich gerade in der Epidermis um zwei separate Substanzen handelt. ROTHBERG und ARP [216] konnten diese Hypothese durch Diskelektrophorese der fraglichen Fraktion stützen: Es waren - zu mindest - zwei Komponenten mit einem MC zwischen 61000 und 70000 auszumachen. Der G_1 -Inhibitor verliert seine Wirksamkeit anders als der G_2 -Inhibitor [116] durch Erhitzen nicht: Erhitzen bei pH 6 in einem kochenden Wasserbad vermochte dem G_1 -Chalon ebensowenig etwas anzuhaben wie in 1 M Ameisensäure bei 70 Grad C. Bei pH 10 wurde die Aktivität allerdings vollständig zerstört. Auch gegen Andauung durch Trypsin - der G_2 -Inhibitor ist dagegen hoch empfindlich -, Pronase, RNase und gegen denaturierende Agentien wie 6 M Harnstoff oder 2%iges sodium dodecyl sulfate (SDS) mit 5 % Mercaptoethanol war der G_1 -Inhibitor beständig. Es muß sich also um eine eigenständige Substanz handeln.

MARKS versuchte nunmehr, das Molekulargewicht des G_1 -Inhibitor zu bestimmen. Nach Desaggregation mit SDS wurde die Gelchromatographie durchgeführt. Diese schien auf ein MC zwischen 1 und 3×10^5 hinzudeuten; nach Pronase-Einwirkung ergaben sich jedoch nur noch Meßwerte zwischen 1 und 2×10^4 . MARKS mußte also konstatieren, daß proteolytischer Abbau das Molekül auf 10 % seiner ursprünglichen Größe reduzierte [169], ohne daß dabei jedoch die biologische Aktivität verloren ging. Er vermutet deshalb, daß es sich beim G_1 -Inhibitor um ein Glykoprotein, bestehend aus einer inaktiven Proteinhülle und einem ziemlich kleinen aktiven Kern, handelt. Nach dem Elutionsmuster ist es nicht auszuschließen, daß die Hüllen in ihrem Aufbau nicht identisch sind [173].

"Chalone-like factors must have one essential quality in

common - tissue specificity of their action. This most important point cannot be stressed too strongly" [173]. Gewebsspezifität konnte für den G_1 -Inhibitor mittels der 3H -Thymidin-Inkorporationsmethode nachgewiesen werden.

4.1.5. Das Verhältnis von G_1 - zu G_2 -Zellen in der Epidermis ("Dichophase-ratio")

Der Zellzyklus einer normalen Epidermiszelle beträgt 7-21 Tage; nach HALPRIM [107], der ihn aufgrund autoradiographischer Untersuchungen bestimmte, beträgt er jedoch zwischen 40 u. 56 Tagen. Keratozyten bewegen sich vom Ort ihrer Entstehung in 14 Tagen nach oben und verweilen dort bis zur Abschilferung weitere 14 Tage. Änderungen sind möglich durch Traumen, hormonelle Schwankungen und Änderungen der Hautbefeuchtung. Trotzdem bleibt das Verhältnis von G_1 - und G_2 -Zellen immer konstant ("Dichophase-ratio" nach BULLOUGH [46]). Bei der Mäuseepidermis bleibt auch die Dicke der Haut konstant; sie gehört nach BULLOUGH daher zum Epidermistyp der ersten Phase [46]. Sie hat eine relativ geringe Mitoserate und damit eine recht lange Zellzyklusdauer; die Basalmembran ist glatt. Auf ihr sitzen prae- und postmitotische Zellen auf; wenn sich eine prämitotische Zelle geteilt hat, bleiben die entstanden Zellen zunächst auf der Basalmembran haften. Es wird eine ältere postmitotische Zelle ausgestoßen, um den nötigen Platz zu schaffen [66]. Dieses "System" funktioniert so lange, bis die Zellzyklen eine solch kurze Durchlaufzeit erreicht haben, das keine benachbarte ältere Zelle mehr ausgestoßen werden kann. Von diesem Punkt an muß sich etwas ändern: Um mehr Platz auf der Basalmembran zu schaffen, beginnt sich die Oberfläche der Basalmembran zu falten. Dadurch wird die Haut dicker. Sie wird zur Epidermis der 2. Phase. Im Gegensatz zur Mäuse- und Rattenepidermis ist die menschliche Epidermis schon im Normalzustand gefaltet; daraus ergibt sich, daß jede Steigerung des Zellwechsels eine Verdickung der Epidermis zur Folge hat. Die am meisten verdickte Epidermis wird bei Psoriasis erreicht, wo die Basalmembran extrem gefaltet sein kann. Im Extremfall kann ein Verhältnis von 4,5 : 1 erreicht werden, wenn man die Zellen der Basalmem-

bran auf die Zellen der Hautoberfläche projiziert [46]. Das Verhältnis von prae- und postmitotischen Zellen bleibt jedoch auch in diesem Falle gleich, ist also eine Konstante. Jedes Zelltrauma, gleich welcher Art, führt zu einer vorübergehenden Hyperplasie. Die Ausbildung dieser Hyperplasie nach einer vorausgegangenen Provokation durch ein Trauma kann durch Chalongabe unterdrückt und ganz verhindert werden, wie FRANKFURT zeigen konnte. Er benutzte das Carcinogen Tween 60 zur experimentellen Auslösung einer Hyperplasie, die unter Chaloneinwirkung jedoch ausblieb [94].

Die Tatsache, daß das Verhältnis prae- und postmitotischer Zellen konstant ist, müßte nun noch auf die Existenz zweier verschiedener Chalons angewandt werden, nämlich G_1 - und G_2 -Chalon. Da es sich bei ihnen um zwei selbstständige und recht unterschiedliche Substanzen handelt, bleibt die Frage offen, wie dieses Simultanverhalten gewährleistet wird. Dieses Problem ist von der Chalonforschung bisher nicht erkannt worden, wie überhaupt die Implikationen des G_1 -Chalons bisher wenig beachtet worden sind [44]. "The nature of the close connection between the mitotic rate and the rate of post mitotic cell ageing is unknown. They are both closely related to the chalone concentration, they change in unison" [44].

Man hat jedoch realisiert, daß die Beeinflussung der G_1 -Phase eng mit der Reifung der Zelle verwoben sein muß, ja sogar, daß dies möglicherweise die eigentliche Funktion des Chalonsystems ist: "A review of the literature led the authors to conclude that the primary function of a chalone is to compel the cells to mature and to maintain them in mature state, thus inhibiting mitosis" [160].

4.2. Theoriebildungen zum Wirkmechanismus der Chalone

4 2.1. Vorbemerkung

Über den Wirkmechanismus und das Verhalten der Chalone in der Zelle haben sich im Laufe der Zeit verschiedene Meinungen entwickelt, die teilweise nebeneinander angeführt werden, ohne daß sich daraus ergebende Widersprüche bemerkt werden.

Unserer Ansicht nach muß die bisher erfolgte Theoriebildung - besser wohl Hypothesenbildung - folgendermaßen unterschieden werden:

1. Bezüglich des innergeweblichen Verhaltens der Chalone

2. Bezüglich des vermuteten Wirkortes der Chalone (Membran, Gen, Organellen usw.)

4.2.2. Das innergewebliche Verhalten der Chalone

Betrachten wir zunächst das innergewebliche Verhalten der Chalone. Auch hier konkurrieren zwei verschiedene Ansichten: Die erste könnte man als die "Theorie der freien Diffusion" bezeichnen, die zweite als die "Theorie der intrazellulären Konzentrierung".

4.2.2.1. Die Theorie der Freien Diffusion

Die Theorie der Freien Diffusion ist die ältere; sie nimmt an, daß das Chalon frei durch das Gewebe zu diffundieren vermag und ist ein Ausfluß des kybernetischen Konzepts der negativen Rückkoppelung. Verliert das Gewebe infolge Verletzung o.ä. Chalon, so könne durch den zwangsläufig erfolgenden Konzentrationsausgleich im Sinne einer Chalonabnahme das übrige Gewebe über den Defekt "informiert" werden und so zur Proliferation angeregt werden.

Die Idee der Freien Diffusion stammt wohl von BULLOUGH, doch sind nie wirkliche Stützen für sie gefunden worden; trotzdem geistert sie noch immer durch manche Publikationen.

Es ist schlecht vorstellbar, daß Moleküle von der Größenordnung der Chalone durch Zellmembranen frei hindurchdiffundieren sollen. Wir werden daher diese Frage später (Kapitel 6.2.4.) noch kritisch zu erörtern haben.

4.2.2.2. Die Theorie der Intrazellulären Konzentrierung

Der "Freien Diffusion" steht die Theorie der "Intrazellulären Konzentrierung" gegenüber. Die Chalone werden intrazellulär produziert und sind dementsprechend intrazellulär höher konzentriert. Es besteht also ein Gefälle zum Extrazellulärraum, das erhalten werden muß, um in der Zelle den "Wirkspiegel" der Chalone zu gewährleisten. Voraussetzung dafür ist eine intakte Membran; ob die Membran die Konzentrationsleistung rein passiv durch die Porengröße oder durch Energieaufwendung erbringt, ist innerhalb dieser Theorie umstritten. BULLOUGH jedenfalls, inzwischen von der "Freien Diffusion" abgerückt, postuliert einen aktiven Pumpmechanismus zur Aufrechterhaltung der intrazellulären Konzentrierung [40]. Für die Richtigkeit der Theorie der Intrazellu-

lären Konzentrierung gibt es Hinweise: Unter pathologischen Bedingungen, z.B. beim Tumorwachstum, scheinen die Membranen das Konzentrationsgefälle nicht aufrechterhalten zu können. Es resultiert ein Chalonverlust ins Blut. Die noch intakten Zellen des entarteten Gewebes werden dadurch verstärkt proliferationsgehemmt: Wenn auch dieser Zusammenhang sehr überzeugend nachgewiesen zu sein scheint, so steht der direkte Beweis für diesen Zusammenhang noch aus.

4.2.2.3. Die Kombinationstheorie

Als Kombinationstheorie möchten wir eine dritte Theorie kennzeichnen, die speziell auf die Verhältnisse in der Epidermis zugeschnitten ist.

Sie ist in der Lage, die nach außen abnehmende Proliferations-tätigkeit in der Epide mis zu erklären, ohne auf die "freie Diffusion" zurückzugreifen. Tortzdem wird - wie bei der freien Diffusion - eine nach außen abnehmende Chalonkonzentration erreicht, und zwar durch die Annahme, daß die Zellpermeabi-lität mit dem Älterwerden der Zelle abnimmt. Dadurch kann die intrazelluläre Chalonkonzentration ansteigen [33 u. 38] . Tatsächlich konnten VAUGHAN und BERNSTEIN [257] feststellen, daß sich die Membran der Epidermiszelle während ihrer Wanderung nach distal rasch ändert.

4.2.3. Ansatzpunkt der Chalone an bzw. in der Zelle

4.2.3.1. Die Gensuppressionstheorie

Sie stammt von BULLOUGH und ist eigentlich mit der "freien Diffusion" verknüpft gewesen. Aber diese Verknüpfung ist nicht zwingend, denn auch bei intrazellulären Konzentrierung könnte sie funktionieren.

Die Gensuppressionstheorie wendet die Erkenntnisse von JACOB und MONOD auf das Chalonkonzept an: "A falling chalone con-centration switches off the genes for ageing and function and switches on the mitotic genes" [31 u. 40] . Die Chalone sind also Suppressoren für ein ganzes Operon.

4.2.3.2. Die Kontakthemmungstheorie

Sie wird im Zusammenhang mit den Chalonen vertreten von JC. HOUCK

und H. HENNINGS; allerdings zunächst nur im Zusammenhang mit Fibroblastenchalon. Wenn Fibroblasten in einer Kultur in vitro angesetzt werden, beginnt nach kurzer Zeit eine Phase logarithmischen Wachstums; das Wachstum hört auf, wenn offensichtlich alle Zellen in engem Kontakt miteinander sind [126 u. 251a]. HOUCK konnte feststellen, daß Extrakte, entweder aus Medium der Fibroblastenkulturen oder aus den Zellen selbst gewonnen, signifikant die Verwertung von markiertem Thymidin herabsetzten; es scheint sich dabei um die Wirkung des enthaltenen Fibroblastenchalons zu handeln (siehe Kapitel 3.10.). HOUCK vermutet nun, daß die Kontakthemmung durch die Addition bzw. Teilung des Chalonpotentials zweier benachbarter Fibroblasten zustandekommt.

Sigmoidförmige Dosis-Wirkungskurven legen die Vermittlung der Chalonwirkung durch Rezeptoren nahe [182]. VERLY rechnete die Dosis-Wirkungs-Beziehungen für das Leberchalon sehr ausführlich durch. Sie stimmt mit anderen rezeptorvermittelten Prozessen überein.

WR. PAUKOVITS fand eine sigmaförmige Dosis-Wirkungskurve für das Granulozytenchalon; auch hier deutet alles auf eine Interaktion mit einem Rezeptor hin [205]. Ebenso [208, 221 u. 258].

4.2.3.3. Präzisierung der Rezeptortheorie: Zyklisches AMP als intrazelluläre Transmittersubstanz der Chalone

Der Gedanke, daß Rezeptoren eine Rolle spielen könnten, drängte sich unter anderem auch deshalb auf, weil es Hinweise für eine Interaktion der Stresshormone mit dem Chalon gab.

Im folgenden müssen wir etwas näher auf das Zusammenspiel zyklisches AMP - Chalon eingehen.

Allem Anschein nach war es IVERSEN, der zuerst die Hypothese aufstellte, daß die Chalonwirkung aus einer Aktivierung der Membran - Adenylzyklase zustande kommt und eine Bildung von zyklischem AMP zur Folge hat [138].

Es ist nun schon seit längerer Zeit bekannt, daß die Stresshormone über die Beta-Rezeptoren einen Anstieg des intrazellulären c-AMP-Spiegels bewirken [53 u. 58], und zwar durch eine Aktivierung der Adenylzyklase [72]. Außerdem ist bekannt, daß zyklisches AMP in der Wachstumsregulation eine nicht unwichtige

Rolle spielt [110 u. 236] . Dem extrazellulären Anstieg der Stresshormone folgt ein intrazellulären c-AMP-Anstieg. Was liegt näher, als ein solches Verhalten auch für die Chalonwirkung am (gleiche ?) Rezeptor anzunehmen?

Ausführlich verglichen PR. COOPER und H. SMITH [72] c-AMP und Chalone hinsichtlich ihrer Wirkungsweise [72] . Sie bedienten sich dabei des Ehrlich-Aszites-Tumors als Versuchsgewebe [72] :

1. EAC-Aszitesflüssigkeit in zellfreiem Zustand, die von einem ausgewachsenem Tumor stammte, war ohne die "Aktivierung" durch Adrenalin und Hydrocortison nicht in der Lage, das Zellwachstum eines jungen gleichartigen Tumors zu bremsen. Ähnliches ist auch vom Chalon bekannt.
2. Die erzielte Hemmung war dosisabhängig.
3. Erhitzen des Chalons auf 100°C ließ den inhibitorischen Effekt verschwinden.
4. Zyklisches AMP verursachte ebenfalls eine dosisabhängige Senkung des Mitoseindex; jedoch war eine Aktivierung durch Stresshormone nicht erforderlich. Erhitzen war ohne Einfluß auf die Wirkung von zyklischem AMP.
5. Die Experimente ergaben für Chalon wie AMP eine signifikante Herabsetzung des mitotischen Index:
Chalonflüssigkeit erzeugte eine 36,2%ige Senkung und zyklisches AMP eine 47,1%ige Senkung über vier Stunden.
6. Beide Substanzen können durch dieselben Klassen von Drogen und natürlichen Substanzen beeinflußt werden.

Zyklisches AMP hemmt die Mitosetätigkeit in der Epidermis genau wie Adrenalin [41 u. 72] , das den Spiegel von zyklischem AMP in der Epidermiszelle zum Ansteigen bringt [112] .

Die Wirkung setzt innerhalb von fünf Minuten ein und kann von Propanolol, einem Beta-Rezeptoren-Blocker, verhindert werden [267, 268 u. 269] .

Noradrenalin, zusammen mit Propanolol verabfolgt, was einen primär Alpha-Rezeptoren stimulierender Effekt hat, hatte keinen signifikanten Einfluß auf c-AMP-Synthese und Mitose [269] . MARKS und REBIEN [170] haben bestätigt, daß zyklisches AMP die epidermale Mitosetätigkeit hemmt.

In den meisten Gewebsarten besteht eine umgekehrte Relation zwischen Proliferationsrate und endogenem zyklischem AMP-Spiegel [198 u. 199]. Er ist erhöht, sobald z.B. Fibroblasten einen dichten Zellrasen bilden und die Proliferation einstellen. CRICK'S [73] Theorie über die Rolle des c-AMP in der Epidermis gleicht BULLOUGH'S Chalontheorie bis ins Detail; nur spielt die Hauptrolle eben das zyklische AMP.

Er unterteilt die Epidermis in "source of cyclic AMP" - das ist der differenzierte Epidermisanteil - und "sink of cyclic AMP" - das ist der proliferierende Epidermisanteil.

Das c-AMP diffundiert von der "source" zur "sink", vermittelt durch Desmosomen oder andere spezialisierte Strukturen der Zelloberfläche. Auf dem Wege zur Basalmembran stimuliert es die Keratinisierung, verliert aber dabei in den untern Schichten immer mehr an Wirkung. Dadurch wird gewährleistet, daß der c-AMP-Spiegel an der Basalmembran normalen Zellersatz erlaubt. Wie der c-AMP-Spiegel die weiteren Mechanismen bis zur schließlichen Mitosehemmung kontrolliert, ist größtenteils ungeklärt und führt in das riesige Gebiet der c-AMP-Forschung hinein. Trotzdem seien einige Hinweise gegeben:

Die AMP-Hydrolyseprodukte leiten die S-Phase ein [123]. Die AMP-ase Aktivität kann durch Calcium gesteigert werden [123], während Chalone den Calciumeinstrom verhindern sollen.

Die cykl. AMP-abhängige Proteinkinase könnte instand sein, mikrotubuläre Subunits zu phosphorylieren [102]. Dadurch könnten auch die Subunits der Mitosespindel angegriffen und ihre Formierung verhindert werden.

Insbesondere F. MARKS vom Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg hat versucht, Licht in das Dunkel der Chalonumsetzung zu bringen. Dabei stieß er auf eine neue Substanz, nämlich das von der Guanylcyclase beherrschte zyklische Guanosinmonophosphat (GMP). F. MARKS glaubt, damit eine weitere wichtige Komponente des "second messenger system" der Epidermis aufgespürt zu haben [172]. Hierzu zählen auch die Adenylcyclase, die zyklische Nucleotidphosphodiesterase, die zyklische AMP-abhängige Proteinkinase und die Guanylzyklase [127].

Genaue Funktionen sind jedoch noch unbekannt; der Spiegel von

GMP konnte nur durch Acetylcholin, und zwar im Sinne eines Anstiegs, beeinflußt werden.

Neuerdings ergaben sich auch Anhaltspunkte für eine Mitwirkung bei der Mitoseregulation.

4.2.3.4. Die Aminosäurentheorie

Sie stammt von JOSEF P. HRACHOVEC und ist, teilweise auch wegen ihres jungen Erscheinungsdatums, auffällig wenig beachtet worden. Jedenfalls hat HRACHOVEC mit seiner Arbeit [172] einen ganz neuen Weg eingeschlagen.

1. Chalonartige Substanzen, die aus der normalen Leber nach der Methode von BULLOUGH gewonnen wurden, hemmen den Aminosäureneinbau durch ribosomalen Angriff. Dieselben Substanzen können auch das Wachstum von Hepatomen einschränken; interessanterweise aber erst, wenn sie in derselben Konzentration verabreicht werden, die bei der normalen Leber wirksam ist.
2. Makromolekulare Substanzen, die aus Leber-Mikrosomen mit Hilfe von Beschallung und Zentrifugation präpariert wurden, hemmen das Hepatomwachstum in Konzentrationen, in denen auch der Aminosäureneinbau durch die Ribosomen gebremst wird.
3. In Mikrosomen von Hepatomen wurde weniger inhibitorische Aktivität gefunden als in gesundem Lebergewebe.

Die Ergebnisse legen den Schluß nahe, wie HRACHOVEC resumiert, daß Chalone in enger Beziehung zum Aminosäurenstoffwechsel stehen und zu den makromolekularen Substanzen, die aus den Mikrosomen entstammen und den Aminosäureneinbau behindern.

Dem entspricht der Bericht von RC. THEUER, der über Aminosäurenrestriktion (Tyrosin und Phenylalanin) das Tumorstadium von implantierten Adenocarcinomen bei Mäusen hemmen konnte, ohne das Gewicht der Tiere signifikant mit zu beeinflussen [255].

5. Teil Chalone, Carcinogenese und Tumorstadium

5.1. Chalone und Carcinogenese

5.1.1. Vorbemerkungen

Spätestens hier erhebt sich die Frage nach der Relevanz der Be-

schäftigung mit Chalonen; lohnt ein so kompliziertes Arbeitsgebiet, bei dem schon die Gewinnung der interessierenden Substanz enorme Schwierigkeiten macht, überhaupt den finanziellen Aufwand?

Schon früh brachte BULLOUGH die Chalone mit der Krebsentstehung in Verbindung: "It has also been obvious that the nature of cancer is most unlikely to be understood until the mechanisms controlling normal tissue mass has itself been elucidated" [113]. 1968 kam unter BULLOUGH's maßgeblicher Mitbeteiligung eine Serie von vier Publikationen in "Nature" unter dem Chiffre "Chalones and Cancer" heraus. Damit unternahm BULLOUGH den Versuch, die Chalone als die für die Entgleisung der Wachstumsregulation in Richtung Krebs maßgebliche Substanz zu avisieren.

Es kann nicht die Aufgabe dieses Kapitels sein, einen umfassenden Überblick über alle Aspekte der Carcinogenese zu geben. Es soll lediglich dazu dienen, einige bekannte und gesicherte Merkmale dem Gesamtproblem Chalone, Carcinogenese und Tumorstadium gegenüberzustellen.

Die Merkmale der Malignität sind:

1. Infiltratives und destruktives Wachstum
2. Metastasierung
3. Atypie = Anaplasie = Abweichung vom Normalbild
4. Polymorphie: Gewebe, Zellen, Kerne
5. Basophilie des Zytoplasmas
6. Kern-Plasma-Relation zugunsten des Kerns verschoben.

Die letzten drei Punkte können auch unter dem Sammelbegriff "Phänotypische Regression" zusammengefaßt werden.

Keine der genannten Eigenschaften ist für sich genommen beweisend für Malignität; nur im gemeinsamen Auftreten erhalten sie schwererwiegende Bedeutung. Nahezu beweisend ist in aller Regel die eingetretene Metastasierung; aber auch hier gibt es Ausnahmen (Pseudomyxoma peritonei). Für sie mag das Postulat von POTTER [167] zutreffen, daß nur Anomalien, die ohne Ausnahme in allen Krebsen gefunden werden, spezifisch sind für Malignität. Biochemisch gibt es - bisher - überhaupt keine deutlich erkennbaren Unterschiede zwischen Krebsgewebe und Normalgewebe. Die phänotypische

Regression tritt vielleicht nur deshalb auf, weil die Zelle garnicht zur Reifung gelangt und ständig das Mitoseprogramm "abspielt" [167].

Häufig geht die Cancerisierung von Zellen auch mit einer Änderung der Chromosomenzahl im Sinne einer Aneuploidie einher [44 u. 214]. Daß genetische Dispositionen eine Rolle spielen, ergibt sich auch daraus, daß beim Krebs Art- und Rassendispositionen und auch familiäre Häufungen bekannt sind [280].

Interessant ist sicherlich auch eine signifikante Gewebsspezifität im Tumorbefall der Organe: Muskulatur und Milz sind selten betroffen [157]. Gewebsspezifität ist bekanntermaßen auch ein essentielles Charakteristikum des Chalonsystems.

Sicherlich kann man aus diesen Merkmalen keine entscheidenden Hinweise für oder gegen eine mitwirkende Rolle der Chalone bei der Carcinogenese entnehmen. Der Grund ist m.E. darin zu sehen, daß die Mechanismen der Entstehung der Malignität noch zu weiten Teilen im Dunkel liegen, wiewohl eine Unzahl von Einzelfaktoren bekannt sind, deren Einordnung Mühe macht.

5.1.2. Interaktionen von Chalonen mit Carcinogenen

Untersuchungen, die eine Interaktion von Carcinogenen mit Chalonen nahelegen, gibt es eine ganze Anzahl.

In den frühen Krebstheorien wurde die Ansicht vertreten, daß die Carcinogene ihre krebefördernde Potenz erst nach Bindung an wachstumsregulierende Substanzen entfalten können [186 u. 207]. Das amerikanische Forscherehepaar MILLER hat, wie F. MARKS berichtet [167], bereits 1947 festgestellt, daß gewisse Carcinogene eine Affinität zu Eiweißen zeigen, die in Tumoren fehlen. Ein Haut-Carcinogen (7,12 - Dimethylbenzanthren) reichert sich im chalonhaltigen 80 %-Äthanol Präzipitat der Haut wesentlich stärker an als z.B. im wenig chalonhaltigen 55-70 %igen Präzipitat [20].

H-Proteine, die das Zellwachstum hemmen, können sich mit Carcinogenen verbinden [264].

In der Leber gibt es spezifische und unspezifische Hemmsubstanzen; die spezifischen Hemmsubstanzen (wahrscheinlich Chalone) werden von dem Carcinogen Diäthylnitroamin stärker angegriffen: Der Extrakt aus dem Lebergewebe DENA-behandelter Tiere hatte ein großes Potential seiner Suppressionskraft auf Lebergewebe ver-

loren; gegenüber Nieren- und anderen Zellkulturen war die Hemmwirkung, die offensichtlich auf unspezifischen Hemmsubstanzen beruhte, unverändert.

Ergebnisse von MARKS [171] deuten darauf hin, daß die DNS-Synthese-Stimulation durch eine Störung des intraepidermalen Chalonmechanismus zustande kommt. "Nach der Applikation des Esters (Phorbolester des Crotonöls, Anm.) ist die Epidermis für längere Zeit unempfindlich für die wachstumsregulierende Wirkung des Chalons. Während dieser Störungsperiode bekommen die transformierten Zellen, die bisher unter der Kontrolle des Chalons standen, Gelegenheit, einen Minimaltumor zu bilden, der dann weiter wachsen kann" [203].

ROHRBACH [213] hat die Auswirkungen von Methylcholanthren auf die Proliferationskinetik der Haut untersucht. Er stellte dabei "Variations in the M-Factor" (für Mitosefaktor) fest. Beim M-Faktor könnte es sich durchaus um das Epidermale Chalon handeln.

IVERSEN [133] stieß über die Beobachtung der epithelialen Proliferationskinetik nach Carcinogenapplikation auf die Chalone; bemerkenswerterweise gehen einige der neusten Veröffentlichungen wieder in diese Richtung [151 u. 215] .

5.1.3. Carcinomentstehung in kybernetischen Systemen

SMITHERS [246] weist darauf hin, daß "80 % aller Krebsformen beim Menschen in Organen mit schnellem und schwankenden Zellwechsel vorkommen". Dies gelte besonders für Haut und Schleimhäute im Verdauungskanal, in den Atemwegen und Harnwegen; ferner für Organe unter hormonalem Einfluß und mit zyklischen Schwingungen, und zwar Uterus, Ovarien und Brustdrüsen bei Frauen und die Prostata bei Männern.

Abstrahierter ausgedrückt, handelt es sich bei diesen Organen um Systeme mit einer komplizierten Kybernetik, die relativ leicht entgleist. Das Resultat ist ein Tumor.

Experimentell konnte man im Hypophysen-Thyreoidea-System durch Störung der Hypophysen- wie der Schilddrüsenfunktion Geschwulste erzeugen; ebenso im Hypophysen-Gonadensystem. Durch Behandlung von Ratten mit Östrogenen wurden Hypophysentumoren hervorgerufen [137] .

Da auch die Chalone Bestandteil eines kybernetischen Systems sind, ist es sicherlich berechtigt, eine Theorie der Entgleisung des Chalonsystems aufzustellen.

Welche Möglichkeiten sind vorstellbar?

1. Es wird zu wenig Chalon produziert.
2. Es wird eine ausreichende Chalonmenge produziert; trotzdem entsteht ein Tumor.

Das kann zwei Gründe haben:

- a) das Chalon erreicht nicht die an den "Meßfühlern" nötige Konzentration
 - α) Chalonverlust durch Membrandefekt
 - β) Chalonverlust durch Carcinogenanbindung
- b) die Meßfühler, z.B. Rezeptoren, sind insuffizient
- c) aus dem Takt kommen der Kybernetik.

Für fast jede der genannten Möglichkeiten gibt es Hinweise:

Zu 1. Zwar wird in den meisten tumorösen Geweben weniger Chalon produziert (für leukämische Zellen [124]), jedoch scheint dies nicht entscheidend zu sein.

Zu 2a. Die am besten belegte Veränderung im Tumorgewebe, die die Chalone betrifft, ist ihre herabgesetzte Konzentration durch einen Chalonverlust; das Gewebe erweist sich als unfähig, das Chalon "zu halten". Damit korrespondiert ein erhöhter Chalongehalt im Blut; die Chalonproduktion hingegen befindet sich auf (fast) normaler Höhe.

Wenn diese Feststellungen richtig sind, müssen wir im nicht tumorösen Restgewebe der betreffenden Gewebsart eine deutliche Senkung der Mitoserate erwarten. Dies konnte in verschiedenen Arbeiten belegt werden:

für die Epidermis beim Wuchern eines V x 2 Tumors [37]
beim Wuchern eines Hewitt-Carcinoms [41]
beim Wuchern eines transplantierten
Hamstertumors [84]

für Melanozyten [36]

für Granulozyten in Diffusionskammern, die in die Bauchhöhle von leukämischen Ratten eingepflanzt worden waren; die Granulozytenanzahl ist

in den leukämischen Tieren deutlich geringer als in den gesunden [260] ; die Zellproliferation im Knochenmark leukämischer Tiere ist natürlich gleichermaßen vermindert, die Anzahl der Progenitorzellen aber aufgrund der Reifungsverzögerung erhöht.

Zu 2b. Bei einmaligem Spülen von Zellen, die 18 Stunden einem Chalonextrakt ausgesetzt waren, konnte die Chalonwirkung an lymphatischen Leukämiezellen leicht rückgängig gemacht werden; dies war bei gesunden Zellen nicht der Fall [124] . Um hier eine Hemmwirkung zu erzielen, muß die Chalonkonzentration bei leukämischen Zellen besonders groß sein. Aufgrund der Rezeptorinsuffizienz oder auch eines Membrandefektes sind die Zellen nicht in der Lage, das Chalon zu binden.

Zu 2c. Die Frage ist, wie man sich ein "aus dem Takt kommen" vorzustellen hat. Wir erwähnten oben bereits einige Beispiele; es handelte sich durchweg um endokrine feedback-Systeme.

Mehrere Studien zeigen [3,22 und 233] , daß im Tumorgewebe signifikante Abnormitäten des membrangebundenen Adenylzyklasesystems bestehen. Obwohl die Richtung der Abnormität unterschiedlich ist, kann man doch folgendermaßen strukturieren:

Normalerweise findet sich im Tumorgewebe eine Aktivitätsverminderung der Adenylzyklase [72] ; in hormonabhängigen und endokrinen Geweben ist dagegen der AMP-Spiegel erhöht.

Nach der Krebstheorie von DAO werden gewisse "latente" Faktoren durch übermäßige und langdauernde Hormonreize (AMP-Bildung!) verstärkt und führen damit zu Krebs 58 . Nach der Krebstheorie von SCHORR und NEY kommen zwei mögliche Veränderungen der Hormonrezeptoren in Frage: erstens: pathologische Erhöhung von Rezeptoren zweitens: Entwicklung von atypischen Rezeptoren [233] . Die Adenylzyklase eines NN-Tumors der Ratte war dosisabhängig stimulierbar durch ACTH, Adrenalin, Noradrenalin,

TSH, LH und FSH (nach SCHORR und NEY). In normalen Geweben konnte keines der genannten Hormone - ACTH als Ausnahme - die Adenylzyklase beeinflussen.

Das "aus dem Takt kommen" der Kybernetik ist also unter Umständen Ausdruck eines Rezeptorschadens; aber nicht im Sinne einer geringgradigen Ansprechbarkeit, sondern im Sinne einer übermäßigen Ansprechbarkeit.

Man kann sich vorstellen, daß durch hohe Hormonspiegel die Zelle stimuliert wird, Rezeptorproteine für dieses Hormon zu bilden, um ihm quantitativ gerecht zu werden. Die Folge ist, daß das intrazelluläre c-AMP noch mehr ansteigt. Schließlich werden auch unspezifische Rezeptorproteine gebildet, sodaß der c-AMP-Spiegel bis auf höchste Werte klettern kann.

Diese Ansicht könnte z.B. auch dadurch gestützt werden, daß anfänglich noch spezifisch hormonempfindliche Tumoren (z.B. Prostata - Östrogen) sich im Laufe der Zeit dieser Kontrolle entziehen [167] ; in Wirklichkeit mag das Hormon zwar noch seinen Effekt haben, der aber unter den vielen unspezifischen Wirksubstanzen nicht mehr durchschlagen kann.

Wohlgemerkt gelten die eben gemachten Feststellungen nur für endogene Tumoren. Das Wachstum der übrigen Geschwulste ist zum Teil durch c-AMP sogar hemmbar: Unter dem Einfluß von c-AMP können sich Sarkomzellen in Fibroblasten zurückverwandeln.

Resumierend können wir sagen, daß es möglich ist, von ganz verschiedenen Aspekten der Krebsforschung Verbindungslinien zum Chalonkonzept der Tumorentstehung zu ziehen. Die Frage der Entstehung der Malignität bleibt allerdings dabei offen.

5.1.4 Die Entstehung der Malignität

Wieso entarten die Zellen eines Gewebes? Chalonverlust kann bisher allenfalls die Entstehung eines gutartigen Tumors plausibel machen, aber nicht die Induzierung von Eigenschaften der Malignität. Warum beginnt eine Zelle zu metastasieren, invasiv und destruierend zu wachsen?

Das Entgleisen der "dichophase ratio" BULLOUGH's, die durch Chalone kontrolliert werden soll, kann dafür kaum herhalten, auch wenn BULLOUGH dies nahelegen versucht: "Basically, this is the situation in Phase 3, and the result is a carcinoma in which the single most important characteristic is that rate (mitosis) > rate (cell death)" [44] .

Jedoch muß man hier BULLOUGH zugute halten, daß er den Chalonverlust nur für die Ausgangssituation hält. Auch IVERSEN meint, daß eine Zerstörung der normalen homöostatischen Balance zwischen Zellentstehung und Zellverlust keinesfalls das entscheidende Ereignis bei der Krebsentstehung sein könne und es keinen schlüssigen Anhaltspunkt für solche Behauptungen gäbe [139]. Schließlich erfolgt die Infiltration des Nachbargewebes nicht nur durch mechanischen Druck, sonder ist vor allem ein aktiver Vorgang, bei dem vom Tumor ausgeschiedene lysosomale Enzyme wie Kollagenasen, Proteasen und Hyaluronidasen die Bindegewebsmatrix depolymerisieren. Auch die Zelladhäsion ist vermindert, was zu Metastasen führt [167].

Eine wichtige Rolle bei der Malignisierung von Zellen scheinen die Lysosomen zu spielen, die eine große Anzahl Hydrolasen in gebundener Form enthalten [91] und andere proteolytische Enzyme, die die Zellteilung und das Ausbrechen aus der Kontakthemmung initiieren können [50] .

Diese Tatsachen lassen sich, zumindest zum gegenwärtigen Zeitpunkt, nicht mit der Chalontheorie der Krebsentstehung in Einklang bringen.

Wir wissen, daß sich die Carcinogenese über lange Zeiträume hinziehen kann. Ein menschliches Hautcarcinom kann Monate und Jahre benötigen, um seine Masse zu verdoppeln [274] . Man unterscheidet deshalb in der Tumorentwicklung gern drei Phasen (nach MARKS [167]), anhand deren man auch gut die Rolle von Carcinogenen und Cocarcinogenen aufzeigen kann.

1. Phase: Das Initialereignis, durch das die gesunde in eine "potentielle" (schlafende) Tumorzelle umgewandelt wird. Es kann durch ein Carcinogen ausgelöst werden.

2. Phase: Die Promotionsphase, während der eine gutartige Geschwulst heranwächst.
3. Phase: Die Progressionsphase, während der das invasive und metastasierende Wachstum einsetzt.

Cocarcinogene sind zwar nicht selbst pathogen, verkürzen aber die 2. u. 3. Phase (z.B. Phorbolester, Crotonöl, Sexualhormone). ZOLLINGER [280] bestätigt, daß ein Tumor nicht unter allen Umständen seinen Dignitätsgrad beibehalten muß, sondern seine Malignität steigern und weiter entdifferenzieren kann.

Beispiele:

1. Zirkumskripte Hyperplasie der Magenschleimhaut → Polyp Adenom (gutartiger Tumor) → infiltrativ wachsendes Adenocarcinom → entdifferenziertes solid wachsendes Carcinom.
2. Leberzirrhose → Hypertrophie des restlichen Parenchyms Hyperplase → Adenombildung → beginnendes Carcinom → infiltratives Carcinom.
3. Analoge Vorgänge beim Hypernephrom [280] .

5.2. Therapie mit Chalonen?

5.2.1. Prinzipielle Überlegungen

Von den zuletzt geschilderten Aspekte aus würde ein Versuch der Therapie von Tumoren mit Hilfe von Chalonen, soweit sie bösartig sind, sehr unwahrscheinlich, wenn nicht aussichtslos sein. Trotzdem sind Untersuchungen dieser Art gemacht worden; zum Teil sogar mit Überraschend gutem Erfolg.

An Kritik dazu hat es nicht gefehlt ("I feel that a word of caution must be raised about optimistic speculations regarding the usefulness of chalones in the treatment of cancer" [139]). Sie wurde im wesentlichen von IVERSEN vorgebracht und betrifft genau den Punkt, daß die Malignität des Tumors vom theoretischen Standpunkt aus durch rein mitosehemmende Stoffe nicht angegangen werden könne.

1. Die invasiven und metastasierenden Eigenschaften könnten nicht beeinflußt werden [281] .
2. Die Mitosebremsung ist für eine Krebstheorie nicht notwendig der richtige Ansatzpunkt, weil die Zellproliferation in Car-

cinomen garnicht so selten langsamer sei als die im Normalgewebe [281] .

3. Die Anwendung von Chalonen müsse ein Fehlschlag sein, wie von den sehr begrenzten Möglichkeiten der Zytostatika demonstriert werde [139] .
4. Die Behandlung von malignen Tumoren mit Gewebsextrakten von normalen Geweben und Tumoren sei in der Vergangenheit oft versucht worden. Alle Versuche seien jedoch gescheitert.
5. Die bisher durchgeführten Versuche an transplantierbaren Tumoren unterlägen einer grundsätzlich anderen Tumor- Wirts- beziehung als Spontantumoren. Therapieerfolge bei solchen Experimenten seien deshalb mit Vorsicht zu betrachten.
6. Es würden bei Tumorpatienten falsche Hoffnungen geweckt. Tatsächlich waren in einer großen englischen Zeitung schon optimistische Berichte erschienen (OBSERVER [87]), die sich auf zum Teil ebenso optimistischer Aussagen in Forschungsberichten stützten [37, 161 u. 220] , z.B.: "This suggests the possibility of the suppression of neoplastic growth by repeated chalone injections" [189] .

Trotz dieser schwerwiegenden und durchaus nicht unbegründeten Kritik IVERSEN'S fuhr man damit fort, Therapieversuche an Tumoren durchzuführen. Natürlich erhebt sich die Frage, unter welcher Vorstellung die Untersuchungen gemacht wurden. Es müssen ja Anhaltspunkte dafür vorhanden gewesen sein, daß zum einen die Tumoren noch unter der Regie irgendeiner Wachstumsregulation stehen und damit eventuell für Chalone empfindlich sind, und daß zum anderen auf irgendeine Weise die Malignität doch beeinflusst werden kann.

Zum ersten Punkt: Fast alle Tumoren zeigen, wenn eine bestimmte Größe erreicht ist, eine Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit bis hin zum Stillstand. Dies ist ein Hinweis für die Tatsache, daß auch maligne Tumoren unter Regie irgendeiner Art von Wachstumsregulation stehen. Im Kapitel 5.2.2. wird davon ausführlicher die Rede sein.

Zum zweiten Punkt: Die teilweise berichteten Tumorheilungen erklärt man sich auf folgendem Wege [44 u. 45] : Die Empfindlichkeit der Tumoren auf Chalone läßt die Möglichkeit zu, sie auf einem bestimmten Niveau zu bremsen. Dies gestattet dem Immunsystem, das von der Menge der malignen Zellen "überrollt" worden ist, wieder seine Kontrolle über die entarteten Zellen zu erlangen. BULLOUGH meint, dieser Gedanke sei vergleichbar mit dem Wirkungsmechanismus vieler Antibiotika [44 u. 45] . Diese wirken bakterio-statisch, k.h., sie verhindern lediglich die Vermehrung der Bakterien. Dadurch erhalten die körpereigenen Abwehrmechanismen die Möglichkeit, das Übergewicht zu gewinnen. Tatsächlich scheint es so zu sein, "daß die Faktoren der Antitumorimmunität offenbar nur in der Lage sind, bis zu einer bestimmten maximalen Zahl von neoplastischen Zellen einen inhibitorischen Effekt auszuüben" [83] .

5.2.2. Das "Sigmawachstum" der Tumoren

5.2.2.1. Begriffsklärung

Unter "Sigmawachstum" ist zu verstehen, daß die Wachstumsrate eines Tumors während der Manifestation und allerersten Entwicklung noch sehr gering ist, um dann stark anzusteigen.

Der ältere Tumor proliferiert mit allmählich sinkender Intensität, bis u.U. eine "Plateauphase" erreicht wird. Ein wirkliches Plateauphänomen wird jedoch nur selten beobachtet, wahrscheinlich, weil der Tod des Organismus diesem Stadium zuvorkommt. Man ist sich generell darüber einig, daß die Wachstumsverminderung vermittelt wird durch eine fortlaufende Verlängerung des Zellzyklus, und - in wechselndem Ausmaß - durch eine Verminderung der Wachstumsfraktion, während der Zellverlust konstant bleibt. Ein solches Verhalten müßte auch für ein von Chalonen gebremstes "eingefangenes" Wachstum postuliert werden.

5.2.2.2. Konventionelle Vorstellung: Sigmawachstum als Ausdruck der Tumorkachexie

In der klassischen Geschwulstlehre ist das Phänomen des Sigmawachstums gut bekannt; daß Geschwulste ulzerieren und schließlich, wenn sie nur lange genug gewachsen sind, nekrotisch werden können, ist jedoch kaum je Gegenstand von kritischen Gedankengängen gewesen. Zu einleuchtend erschienen die Mechanismen und Überlegungen, die sich hier sofort aufdrängen:

Der Tumor unterbricht seine Ernährung selbst,

- a) indem er die ernährenden Gefäße unterbricht
- b) durch zu schnelles Wachstum: die ernährenden Gefäße halten nicht mit dem Tumorstadium Schritt (ZOLLINGER Seite 229: "Napoleon in Rußland").
- c) durch wachsende Konkurrenz der Zellen untereinander um Nährstoffe.
- d) indem er seinen Wirtsorganismus schädigt
 1. durch Produktion toxischer Metaboliten
 2. durch sein parasitäres Wachstum und durch den Entzug lebensnotwendiger Substanzen → Tumorkachexie des Wirtes.

5.2.2.3. Neuere Vorstellung: Sigmawachstum als Ausdruck einer spezifischen Wachstumsregulation

Daß die oben geschilderten Ansichten in ihrer Gesamtheit ein hartnäckiges Dogma in der Medizin darstellen, geht daraus hervor, daß es lange, bevor sie von der Chalonforschung - wie wir noch sehen werden - recht eindeutig widerlegt worden, eine ganze Reihe Untersuchungen gab, die von einem anderen Ansatz aus die eben genannten Theorien stark erschütterten, ohne sich jedoch durchzusetzen.

Hier eine kleine Übersicht:

CHRISTENSON 1952: Die Konzentrationsleistung von (Aszites-) Tumorzellen ist größer als die von Muskel- und Leberzellen. Sie kommen also mit sehr geringen Mengen von zugeführten Nährstoffen aus [65] .

KLEIN u. KLEIN 1956: Der Glucosegehalt der Aszites-Flüssigkeit wird stark ausgeschöpft; die Glycolyse läuft maximal [148] .

- JOHNSTON 1956 : Der Tumor kann Aminosäuren schnell und extensiv konzentrieren: "This gives a stronger picture of prosperity rather than of starvation" [141] .
- HAUSCHKA et al. 1955 u. 1957: Hyperdiploide und hypertetraploide Zellen erreichten ihre Maximalzahl von 2×10^9 bzw. 1×10^9 Zellen in prosperierenden wie in ausgehungerten Tieren [108 u. 109] .
- GOODMAN 1957: Beim Tod von tumortragenden Tieren war die Tumormasse stets gleich; wenn es sich um zwei Tumoren handelte, teilte sich demgemäß die Gesamtmasse auf die beiden Tumoren auf [101] .
- LAIRD 1964: Auch Tumoren sind noch von einer Art der Wachstumskontrolle, wahrscheinlich im Wege eines Rückkopplungsmechanismus, abhängig [153] .
- GREEN 1966: Tumoren lassen sich durch Diäten nicht erheblich beeinflussen; sogar bei fastenden und partiell Leberresezierten war kein bemerkenswerter Effekt zu erzielen. Im Gegenteil: das Tumorstadium nimmt ab, wenn der Allgemeinzustand des Patienten gut ist [104] .

5.2.2.4. Chalone und Sigmawachstum

5.2.2.4.1. Die Chalontheorie des Sigmawachstums

Die Produktion von Hemmsubstanzen durch Tumoren wirft die Frage auf: Kann das Sigmawachstum mittels dessen, was über das Verhalten von Chalonen in tumorösen Geweben bekannt ist, erklärt werden?

Da der Tumor, was zum Teil gesichert ist, nicht in der Lage ist, das Chalon auf der Zelle (Rezeptorthorie, Kontakthemmungstheorie) oder in der Zelle (intrazelluläre Konzentrierung) zu konzentrieren, kommt es zum Abströmen ins Blut. Dies wird durch die herabgesetzte Proliferationstätigkeit der gesunden Zellen demonstriert [37 u. 41] . Schließlich ist die Chalonkonzentration im Blut soweit angestiegen, daß auf diesem Wege die Hemmkonzentration an den Tumorzellen wieder erreicht wird:

"First the mitotic activity of tissue of origin is inhibited and later the mitotic activity of the tumor itself is inhibited; consequently tumor growth follows a sigmoid curve" [45] . Auf diese Weise wird die Plateauphase erreicht [41] .

5.2.2.4.2. Literaturüberblick: Substanzen die das Tumorstwachstum limitieren

Auch hier sei ein kurzer Überblick über ältere Literatur gegeben, die Hinweise nicht nur auf die Selbsthemmung von Tumoren gibt, sondern auch auf die Verursachung durch wachstumshemmende Substanzen. Als ein besonders geeignetes Untersuchungsobjekt haben sich hier Aszites-Tumoren erwiesen. Deswegen teilen wir die Übersicht in einen allgemeinen Teil und in einen Aszites-Teil auf.

5.2.2.4.2.1. Allgemeiner Teil

HORAVA 1954: Nekrotisierende Reaktionen, als floriden Tumoren Gewebsflüssigkeit 18 Tage alter Tumoren zugeführt wurde. Gewebsflüssigkeit 6 Tage alter Tumoren hat diese Eigenschaft noch nicht [117] .

STOLTZ 1967: Wenn 80 % eines Primärtumors bei Hamstern entfernt werden, war das Rückfallwachstum meistens schneller als das vor der Resektion [251] .

Das Rezidivwachstum nach unvollständiger chirurgischer Resektion ist ein altbekanntes Problem [7 u. 183] , ebenso wie das Aufschließen von Metastasen nach Entfernung des Primärtumors [56, 81, 144 u. 194] . Verschiedene Autoren wiesen nach, daß hierfür nicht eine vermehrte Abschwemmung von Tumorzellen durch die chirurgische Manipulation verantwortlich zu machen ist [164a] .

5.2.2.4.2.2. Spezieller Teil: Aszites-Tumoren

Für die Selbsthemmung von Aszites-Tumoren gibt es eine große Anzahl von Beispielen [8, 98, 150, 192, 200] .

WU 1959: Aszites-Tumoren produzieren Substanzen, die in die Aszites-Flüssigkeit abgegeben werden. Elektrophorese-Auswertungen ergeben Abweichungen von dem Muster, das man erwartet hätte, wenn nur Serumbestandteile vorgelegen hätten [278] .

Die bewußt unter dem Blickwinkel der Chalone betriebene Forschung an Aszites-Tumoren wurde ausschließlich von P. BICHEL unternommen. Zur Erforschung der Plateauphase an Tumoren sind Aszites-Tumoren besonders geeignet; es ist geradezu ihr Charakteristikum, daß sie die Plateauphase - im Gegensatz zu den meisten anderen Tumoren - noch vor dem Tode des Gesamtorganismus erreichen. Das mag daher rühren, daß ein Zellverlust aus dem Inneren der Peritonealhöhle nicht möglich ist und es kaum zu Nekrosen kommt. Nekrosen im Inneren von soliden Tumoren mögen die Ursache dafür sein, daß sie die Plateauphase selten erreichen [52] . Beim Walker-Carcinom [256] sank kurz vor dem Auftreten von Nekrosen der Mitoseindex deutlich ab, um dann wieder anzusteigen [11] . Beim Aszites-Tumor liegt überdies ein besonderer Vorteil in der leichten Gewinnbarkeit der Gewebsflüssigkeit; man kann sie durch einfache Punktion der Peritonealhöhle erhalten. Im Punktat müssen wegen der suspendierten Natur der Zellen die Hemmsubstanzen enthalten sein. Es muß lediglich durch Zentrifugation nach zellfrei gemacht werden.

Zweierlei kann nach einer Punktion beobachtet werden:

- a) Im punktierten Tier setzt ein deutlicher Proliferationsschub der noch verbliebenen suspendierten Zellen ein [12 u. 59] , der, wie BICHEL selber schreibt, an das Wachstum nach partieller Hepatektomie erinnert.
- b) Dieses wiederaufschießende Wachstum kann durch Reinjektion der zellfreien Aszites-Flüssigkeit wieder deutlich gebremst werden [12] .

5.2.2.2.3. Das Aszites-Chalon

Damit ist ein weiteres Mal der Gedanke widerlegt worden, die Selbsthemmung von Tumoren werde durch unspezifische Mechanismen wie O_2 -Mangel, toxische Metaboliten, Tumorkachexie usw. bewirkt. Weder O_2 -Mangel noch Glucose-Mangel können auch die von BICHEL festgestellte Verlängerung des Zellzyklus erklären [120] . Er konnte, wie weiter oben bereits erwähnt, nach einer einmaligen Injektion einen G_1 -Block für die Dauer von vier Stunden feststellen, einen G_2 -Block für die Dauer von 1 1/2 Stunden [84] . Ein solches Verhalten wäre jedoch auch bei Chaloneinwirkung zu erwarten. Durch Ultrafiltration der zellfreien Aszites-Flüssigkeit

war es möglich, zwei Fraktionen zu trennen; die eine mit einem MG zwischen 1000 und 10000 hemmte Zellen in der G_2 -Phase, die andere mit einem MG zwischen 10000 und 50000 hemmte die G_1 -Phase. Die hemmenden Eigenschaften konnten durch proteolytische Enzyme zum Verschwinden gebracht werden; eine proteinartige Substanz sollte also zugrunde liegen. Auch das wäre für ein Chalon typisch. Damit ist einerseits in ausreichendem Maße die Empfindlichkeit von Tumoren für wachstumsregulierende Substanzen belegt, und andererseits wahrscheinlich gemacht worden, daß Chalone dabei eine wichtige Rolle spielen. Das Sigmawachstum der Tumoren erweist sich damit als eines der überzeugendsten Argumente für die Existenz von Chalonen.

5 2.3. Chalonwirkung auf Tumoren im Experiment

5.2.3.1. Vorbemerkungen

Es sind bisher insgesamt neun Arbeiten bekannt, die sich mit der Reaktion von Tumoren auf Chalonapplikation befassen, wenn wir die Aszites-Tumoren mit hinzu nehmen.

1967 erschienen unter der zusammenfassenden Überschrift "Chalones and Cancer" gleich vier Arbeiten, die sich diesem Thema widmeten: Zwei Melanome, ein Epidermaler Tumor und eine Leukämie wurden beschrieben. Die Resultate waren, so schien es, überwältigend gut. Betrachten wir aber die Ergebnisse nach Geweben getrennt.

5.2.3.2. Epidermale Tumoren

BULLOUGH ging zuerst der Frage nach, ob in einem Tumor - z.B. dem Epidermalen V x 2 -Tumor - überhaupt noch Chalonsubstanz noch vorhanden ist. Tatsächlich konnte aus dem Tumorgewebe biologisch aktives Chalon erhalten werden [37]. In einem weiteren Schritt sollte dann erprobt werden, ob die Tumorzellen noch die Fähigkeit behalten haben, auf Chalon zu reagieren. Auch diese Frage konnte positiv beantwortet werden.

Damit ergaben sich zwei Möglichkeiten:

1. Der Tumor produziert Chalon in ungenügender Menge.
2. Der Tumor produziert Chalon in genügender Menge, hat aber die Fähigkeit verloren, es am Wirkort in ausreichender Menge zu konzentrieren.

Der 2. Theorie wurde der Vorzug gegeben, denn die gesunde Epidermis in tumortragenden Tieren war in ihrer mitotischen Aktivität deutlich retardiert. Dieser Umstand kann gut erklärt werden, wenn man annimmt, daß er durch aus dem Tumor abgeströmtes Chalon zustande kommt.

Das HEWITT-Carcinom, ein keratisierender Tumor der Maus, soll ununterscheidbar von seinem klinischen Homologen sein [114] ; er ist im Jahre 1965 spontan entstanden und soll bezüglich seiner Eigenschaften kein typischer Transplantationstumor sein. Die mitotische Aktivität der gesunden Restepidermis bei Mäusen war hier um 50 % gesenkt [41] . Mit dem Alterwerden und Größerwerden des Tumors wurde auch dessen Proliferationsaktivität geringer (Sigmawachstum), wahrscheinlich als Resultat einer ansteigenden Serumkonzentration von Chalon.

Chalonapplikation in vivo hatte, wie BULLOUGH mitteilt, zwar eine meßbare, aber keine signifikante Wirkung auf die Tumoren. Eine größere Dosis erschien nicht ratsam, weil wegen des Reinheitsgrades der Schweinehautextrakte zytotoxische Wirkungen befürchtet wurden. Höher gereinigte Extrakte, wie sie im Fall des V x 2-Tumors verwandt wurden, standen bei der Untersuchung des HEWITT-Carcinoms nicht zur Verfügung.

In vitro wurden unter Mitwirkung von Hydrocortison und Adrenalin sehr große Hemmeffekte erzielt, nämlich bis zu 87 %.

ELGJO 84 untersuchte die Wirkung von Chalonen auf den Chernozemski-Tumor, der zuerst 1967 beschrieben wurde [59] . Es handelt sich um einen transplantierbaren epidermalen Hamstertumor; es wurden nur in vivo Versuche durchgeführt. Der Tumor war auf Chalongabe empfindlich; sowohl die G₁-Phase als auch die G₂-Phase waren betroffen. Damit war ein Chalonangriff auf die G₁-Phase auch in Tumoren nachgewiesen.

Die DNS-Synthese-Rate zeigte - im Gegensatz zu früheren Ergebnissen [111] - bereits nach vier Stunden eine Reaktion. Dies wurde auf die in den Tumorzellen verkürzte Dauer des Zellzyklus zurückgeführt. Die Mitosedauer in chalonbehandelten Zellen betrug 0,9 Stunden, in den mit unwirksamem Leberextrakt behandelten Zellen 0,6 Stunden. Ein Versuch mit höheren Dosen Chalonextrakt hatte offensichtlich toxische Wirkungen: Lebervergrößerung, hämorrhagische Flüssigkeit in der Bauchhöhle, ein fibrinöses Exsudat auf

den Eingeweiden. Die Tiere starben am 5. Tag.

5.2.3.3. Leukämien

RYTÖMÄÄ untersuchte eine Shay's myeloische Chloroleukämie (CHL) bei Ratten [218] .

In vorausgehenden Versuchen [219] hatte er bereits klar gestellt, daß Granulozytenchalon sowohl aus dem Serum erkrankter Tiere als auch aus den veränderten Zellen selber gewonnen werden kann. Ein Vergleich mit normalen Zellen ergibt, daß in den leukämischen Tumorzellen nur 1/10 bis 1/40 des normalen Chalongehalts enthalten ist. Im Serum ist dafür das Chalon im Exzess enthalten.

Die Tumorzellen erwiesen sich als empfindlich gegen Chalon in vitro. In vivo wurden i.p. und i.v. Behandlungen durchgeführt; auch hier ergab sich eine Proliferationshemmung der leukämischen Zellen sowie der Progenitorzellen im Knochenmark.

In vitro-Ergebnisse:

1. Normale Granulozyten der Ratte, des Menschen und des Rindes enthalten Chalon, desgleichen leukämische Zellen des Menschen und der Ratte.
2. Das Chalon bremst die DNS-Synthese in normalen Progenitorzellen, aber ebenso in leukämischen Zellen von Mensch und Ratte.

In vivo-Ergebnisse:

Die in vivo-Experimente erfordern erhöhte Chalonmengen. Um 40 junge Ratten zu behandeln, wurden 100 Liter Ochsenblut als Ausgangsmaterial zur Chalongewinnung benötigt.

Als Versuchstumor wurde eine generalisierte Leukämie benutzt [161] . Bei der - in einem früheren Experiment verwendeten - subcutanen Einpflanzung von chloroleukämischen Infiltrationstumoren kann es nämlich zu wirklichen Spontanheilungen kommen, da der Tumor nur eine lokale Dimension besitzt; auch scheinbare Spontanheilungen durch den Umstand, daß die Transplantate nicht angehen, können vorkommen.

Im Gegensatz dazu sind bei generalisierter Leukämie noch keine Spontanheilungen bekannt geworden; auch wuchsen sämtliche i.p. vorgenommene Transplantationen bei einigen hundert Ratten ohne

Ausnahme an [225] . Damit steht im Einklang die größere Malignität, die sich in einer um 50% verkürzten Überlebenszeit ausdrückt.

In einer ersten Versuchsreihe von [14] Experimenten, in der recht geringe Dosen von ziemlich unreinen Präparationen von Granulozytenchalon verwendet wurden, konnte die Überlebenszeit der behandelten Ratten um 11,2 % im Durchschnitt verlängert werden. Die längste Überlebenszeit der Kontrollratten betrug 24 Tage, während eine behandelte Ratte sogar 39 Tage überlebte.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde hochgereinigtes Chalon benutzt; es gab 42 Kontrolltiere und 40 chalonbehandelte Tiere. Die Kontrolltiere starben sämtlich; von den zunächst überlebenden 18 Ratten aus dem Kollektiv der behandelten Tiere starben später noch neun an Leukämie. Die restlichen zeigten während der Beobachtungsperiode von einem Jahr keine Zeichen von Leukämie.

RYTÖMAA und KIVINIEMI führten einen weiteren in vivo Versuch durch; die leukämischen Tumoren verschwanden nach s.c. Injektion, bei einigen war sogar von einer permanenten Heilung zu sprechen [224] .

5.2.3.4 Melanome

Harding-Passey-Melanome wie auch Amelanotische Melanome (GREEN, FORTNER) enthalten noch Melanozytenchalon; auch für die Melanome konnte nachgewiesen werden, daß sie nach wie vor auf Chalone reagieren [161] .

Die in vivo Experimente wurden an Harding-Passey-Melanomen, die auf NRMI-Mäuse transplantiert worden waren, und an Amelanotischen Melanomen syrischer Hamster durchgeführt. Wenn die Melanome zu Kirschgröße ausgewachsen waren, erfolgte die s.c. Injektion. Mit der Optimaldosis (bei Mäusen 100 bis 200 mg, bei Hamster 200 mg) waren die Reaktionen in beiden Tumoren prompt und gleichartig: Sie wurden weich und nekrotisch, schließlich ulzerierten sie und heilten dann völlig aus. In den Kontrolltieren traten keine Spontanheilungen auf. Die meisten behandelten Mäuse und alle Hamster waren jedoch nach Absetzen der Behandlung von Tumorrezidiven und Metastasenwachstum betroffen. Die Behandlung dauerte allerdings nur fünf Tage.

Trotzdem waren acht Mäuse noch nach zehn Monaten nach Versuchsende am Leben und melanomfrei.

5.2.3.5. Kritik der Chalonwirkung auf Tumoren

5.2.3.5.1. Auslösung von Immunmechanismen

Die nach Chalonbehandlung gefundenen Veränderungen können theoretisch durch immunologische Mechanismen bedingt sein, die nicht mit der inhibitorischen Eigenwirkung der Chalone zusammenhängen:

- a) Bei einer Injektion der meist nur grob gereinigten Gewebsextrakte wird immer auch eine gewisse Menge Fremdprotein verabreicht. Dieses in Verbindung mit dem Chalon, das ja ebenfalls Eiweißcharakter hat, kann einen unspezifischen Reiz auf das Immunsystem bedeuten [139 u. 190] .
LAURENCE und HANSEN [159] konnten hingegen solche generellen Eiweißwirkungen ausschließen. Chalonextrakt wurde durch Erhitzen auf 100 Grad C denaturiert, und anschließend injiziert. In dieser Form verabreicht, ergab sich keine inhibitorische Wirkung auf den Mitoseindex.
- b) Der Inhibitor (Chalon) kann möglicherweise ein spezifisches Antigen sein, das die Bildung von spezifischen gegen Tumorzellen gerichteten Antikörpern hervorruft [62] .
- c) Da wegen der schnellen Reaktionszeit nach der Applikation oftmals die Möglichkeit der Aktivierung des Immunsystems nicht in Frage kommt - sie würde mehr Zeit beanspruchen [189] - wurde eine lokale Schwartzmann-Reaktion von IVERSEN ins Kalkül gezogen [139] . Ein solcher Vorgang ist jedoch ein äußerst seltenes Ereignis.

Nach unserer Ansicht sind die applizierten Eiweißmengen in allen Fällen so gering, daß immunologische Abläufe in einer meßbaren Größenordnung kaum zum Zuge kommen können. Nur bei länger dauernder Behandlung könnten sie unter Umständen im Wege der Sensibilisierung eine stärkere Bedeutung bekommen.

5.2.3.5 2. Zytotoxische Effekte

Die Arbeit von MOHR et al. [189] haben wir bereits kurz vorgestellt. Wegen ihrer besonderen Rolle, die sie gespielt hat,

werden wir im folgenden noch etwas näher darauf eingehen. Diese Arbeit war einer der ersten Versuche, einen Tumor (Melanom) durch Chalonapplikation zur Rückbildung zu bringen. Amelanotische Melanome (GREEN, FORTNER) wurden auf syrische Hamster verpflanzt und Harding-Passey-Melanome auf Mäuse. Mit einer optimalen mittleren Dosis gelang es nun wirklich, die Tumoren zu beeinflussen: Sie wurden weich und nekrotisch, das Amelanotische Melanom wurde dunkler. Im einzelnen sahen die Ergebnisse so aus:

Bei 200 Hamstern verschwanden alle Melanome vollständig; bei 3000 Kontrolltieren gab es demgegenüber nicht eine einzige Spontanregression. Bei den Mäusen kam es immerhin noch 75 mal zur Rückbildung des Melanoms, verglichen mit 1000 Kontrolltieren ohne Regression. Im weiteren Verlauf traten zwar bei den meisten Mäusen und Hamstern, wie im Kapitel 5.2.3.4. bereits erwähnt, Rezidive und Metastasen auf; acht Mäuse lebten jedoch noch etliche Monate nach Beendigung der Experimente, ohne daß neue Tumoren gesehen wurden. Wir gehen auf diese Arbeit so ausführlich ein, weil zytotoxische Effekte sehr eingehend durch mehrere Prüfungen ausgeschlossen wurden.

- a) Leberextrakte und hochgereinigte Hautextrakte waren wirkungslos.
- b) Sporen anaerober Bakterien (Clostridien), wie von MÜSE beschrieben, wurden morphologisch und mikrobiologisch ausgeschlossen.
- c) Eine Immunreaktion schied wegen der kurzen Latenzzeit bis zum Wirkungseintritt von vornherein aus.
- d) Es wurde gezeigt, daß die Hautextrakte auf andere Tumoren keinen Effekt hatten (Walker-Carcinom, KG-13 Plasmozytom bei Hamstern, Mastozytome (Furth) bei Mäusen).
- e) Durch eine EDTA-Injektion wurde eine mögliche Chelatbildung der Hautextrakte ausgeschlossen.

Die naheliegende Ansicht, daß die Wirkung auf den Tumor dem Hautextrakt und damit dem Melanozytenchalon zugeschrieben werden müsse, nahmen MOHR et al. später zurück [191] und behaupteten, die schnelle Ulzeration sei auf eine toxische Verunreinigung durch einen neuen Clostridienstamm zurückzuführen. Dieser hat die Ei-

genschaft sich selektiv im Tumorgewebe anzusiedeln und dort eine Antitumorwirkung zu entfalten: "Paper ... ([189] , Anm.) described the striking oncolytic properties of some pig skin fractions which could not be attributed to an epidermal chalone as we originally believed" [191] .

Die Eigenschaften des Clostridienstammes werden wie folgt beschrieben [191] :

- a) Keine pathogenen Wirkungen in tumorfreien Tieren.
- b) Starke onkolytische Eigenschaften bei transplantierten Tumoren.
- c) Enttäuschend geringe Wirkung auf induzierte und spontane Tumoren.

Die Konsequenzen dieser Funde sind klar: Alle Chalonanwendungen auf Tumoren, die bisher in Angriff genommen waren, waren damit nicht nur relativiert, sondern in Zweifel gezogen (im Grunde natürlich nur diejenigen, die epidermalen Schweinehautextrakt benutzt hatten). Die Testung auf Gewebsspezifität hätte - würde man MOHR folgen - ihre besondere Bedeutung verloren, zytotoxische Nebenwirkungen sichtbar machen zu können [10] . An gesundem Testgewebe wird die Zytotoxizität des Clostridienstammes nämlich verschleiert: Sie kommt erst auf Tumoren zum Tragen. Durch eine neue Qualität der Spezifität, nämlich der Tumorspezifität, wird also der Test auf Gewebsspezifität unterlaufen. Trotzdem erscheint die Selbstkritik MOHR's aus verschiedenen Gründen nicht stichhaltig:

1. Schon 1968 war MOHR das Problem der Clostridienstämme, deren Erforschung bis in das Jahr 1959 [188] zurückgeht, lange bekannt; deshalb schloß er sie ja schon damals als wirksame Agentien morphologisch und mikrobiologisch aus ("Spores of anaerobic bacteria, which might lead to tumor regression as reported by MÖSE, were excluded as causative agents morphologically and microbiologically" [189]).
2. Auf andere Tumoren (Walker-Carcinome bei Ratten, KG-13-Plasmozytome bei Hamstern und Mastozytome bei Mäusen) war der Extrakt wirkungslos!

3. Die Revision der Ergebnisse erfolgte erst nach vier Jahren; zwingende Rückschlüsse auf Verunreinigungen im Jahre 1968 läßt dies wirklich nicht mehr zu, auch wenn auf Schweinehaut dieser Bakterienstamm häufiger nachgewiesen werden kann.

Es kann auch generell nicht behauptet werden, daß die Chalonforschung dem Problem der zytotoxischen Verunreinigungen keine Beachtung geschenkt hätte. Besonders HOUCK hat dieses Feld bearbeitet [121, 123], siehe auch Kapitel 2.3.3. Da es zur Zeit nicht möglich ist, Chalons in chemisch ganz reiner Form darzustellen, wird man in hoher Konzentration stets zytotoxische Effekte feststellen können [67 u. 84]. BULLOUGH bringt aus diesem Grunde bei der Untersuchung des HEWITT-Carcinoms keine hohen Extraktkonzentrationen zur Anwendung [41].

Von starken Reaktionen der Versuchstiere auf wiederholte Chaloninjektionen berichtet ELGJO, wie bereits im Kapitel 5.2.3.2. erwähnt, als wenige Hamster mit großen Chalonmengen i.p. behandelt wurden [84]. Zwei von ihnen starben nach fünf Tagen mit zytotoxischen Zeichen. ELGJO trug diesem Problem Rechnung, indem er späterhin [87] einen Teil der behandelten Tiere drei Stunden nach erfolgter Chaloninjektion tötete, um sie auf Zeichen von Zytotoxizität zu untersuchen.

FRANKFURT fand selbst nach vier Injektionen keine Anzeichen für zytotoxische Effekte [94].

Bei Verwendung von Lymphozytenchalon konnten keine zytotoxischen Nebenwirkungen gefunden werden, in einem anderen Fall war es möglich, sie nach Ultrafiltration des Extraktes zum Verschwinden zu bringen [179].

Langzeitbehandlung jugendlicher Ratten zeigte, daß das Chalon keinen generellen Einfluß auf das Wachstum hat. Die Ratten entwickelten sich normal [225].

Grundsätzlich muß mit HOUCK gesagt werden, daß zytotoxische Effekte primär ein Problem der in vitro Studien sind [121 u. 123]. Leber und Niere limitieren in lebenden Organismen den Einsatz von zytotoxischen Material beträchtlich.

5.2.4. Spekulative Anwendungsmöglichkeiten der Chalone

Ein Haupteinwand gegen den Einsatz der Chalone bei der Therapie maligner Tumoren ist steht gewesen, daß das schon aus theoretischen Erwägungen solche Experimente zum Scheitern verurteilt seien; zwar sei es möglich, gutartige Tumoren zum Stillstand zu bringen, das Merkmal der Malignität sei aber mit einem Eingriff in den Zellzyklus nicht zu beseitigen.

IVERSEN, der sich diese Argumente zueigen gemacht hatte, sah daraufhin die Chalonforschung für gescheitert an. Seine allzu pessimistische und resignierende Rückschau [137] auf die Chalonforschung war sicherlich verfrüht; denn es gibt doch Anzeichen dafür, daß auch maligne Gewebsverbände den Kontrollmechanismen des Körpers nicht vollständig entzogen sind; dies konnte im Kapitel 5.2.2. ausführlicher belegt werden.

Weiter konnte gezeigt werden, daß das Sigmawachstum aller Wahrscheinlichkeit nach chalonbedingt ist. Im Kapitel 5.1.4. schließlich haben wir ausgeführt, daß Malignität sich nicht mit einem Schlage entwickelt. Das Hypernephrom wächst zunächst scharf abgegrenzt in das umliegende Gewebe vor, bevor es seine infiltrierenden Eigenschaften entfaltet.

Ein Tumor kann durchaus auch seine Malignitätsstufe wechseln [280]. Und last, but not least können die mit Chalonbehandlung gelungenen Tumorheilungen nicht sämtlich auf "Spontanheilungen" zurückgeführt werden; zwar sind Spontanheilungen bei Transplantationstumoren höher als bei anderen (Chloroma-Leukämie bis zu 30 %), es sind jedoch inzwischen (siehe Kapitel 5.2.3.2.) transplantable Tumoren entwickelt worden, die ihren klinischen Homologen in jeder Weise ähneln sollen (HEWITT-Tumor). Auch bei diesen konnten mit Chalonen Erfolge erzielt werden.

Es sind verschiedene Denkmodelle entwickelt worden, in welchem Rahmen Chalone eingesetzt werden könnten und über welche Mechanismen sie eine Tumorregression induzieren könnten.

Den Vorschlag BULLOUGH's und anderer hatten wir bereits erwähnt (in Kapitel 5.2.1.); wir kommen an dieser Stelle noch einmal darauf zurück, weil es in der Krebsbehandlung bereits eine Therapieform gibt, die der Vorstellung BULLOUGH's gleichkommen würde: Nämlich bei der Hormonbehandlung des Prostata- bzw. Mamma-

carcinoms. Bei der Anwendung der jeweils wachstumsbremsenden Hormone gibt man sich nicht der Hoffnung hin, daß sie per se die Malignitätseigenschaft des Tumors beseitigen kann. Es würde aber, wenn man BULLOUGH's Gedanken auf diese Therapie anwendet, dem Immunsystem durch "Einfangen" der Zellproliferation ein erneutes Eingreifen in einen Prozeß gestattet werden, der seiner Kontrolle entglitten schien. Ein echter Vergleich kann jedoch nicht gezogen werden, da die Hormonbehandlung wegen ihrer Nebenwirkungen erst in späten Stadien eingeleitet wird (Stadium C u. D des Prostatacarcinoms [2]; für die Hormonbehandlung des Mammacarcinoms nach KEPP/STÄMMLER [143] Androgene und Kastration nur als Zusatztherapie). Außerdem entziehen sich anfänglich noch hormonempfindliche Tumoren im Laufe der Zeit dieser Kontrolle [167 u. 2]. Kurzfristige Anwendung kann sogar mitosestimulatorisch wirken; langfristige Anwendung führt dann zunächst zur Mitosehemmung, schließlich aber wieder zum Wirkungsverlust durch Desensitivierung.

Skeptiker meinen zu diesen Gedanken, der immunologische Ansatz sei wahrscheinlich richtig; allerdings sei die Tumorheilung eher durch eine unspezifische Reizung des Immunsystems durch die Eiweißeigenschaften der Chalone als auch durch Verunreinigung des verabreichten Extraktes mit Proteinen zu erklären [139 u. 190]. Dieser Einwand scheint jedoch bei näherer Betrachtung recht absurd, da es sich bei der Chalongabe um kleinste Mengen handelt, die mittlerweile auch in höchstgereinigter Form hergestellt werden können.

SCHÜTT's Vorschläge zur Chalonanwendung in der Tumorthherapie [234] beziehen sich auf das Granulozytenchalon. Seine Publikation ist, nebenbei bemerkt, die einzige in der Chalonliteratur, die sich hauptsächlich mit Therapieproblemen beschäftigt.

Das Granulozytenchalon bietet am ehesten die Gewähr, sinnvoll eingesetzt zu werden.

Nach SCHÜTT gibt es dafür drei Gründe:

1. Neben dem Epidermalen Chalon ist das Granulozytenchalon das am besten charakterisierte.
2. Das Granulozytenchalon kann in relativ großen Mengen auf relativ einfache Weise präpariert werden.

Entfällt:
=====

3. Die Beseitigung der meist myelotoxischen Nebenwirkungen, die durch das Granulozytenchalon möglich gemacht werden könnte, ist eines der wichtigsten Probleme in der heutigen Krebstherapie.

In der Tat sind der Abfall des Hb und der Leukozyten meist, insbesondere bei Zytostatika-Behandlung, therapielimitierend. Unter Zuhilfenahme des Granulozytenchalons könnte es gelingen,

1. die Maximaldosis von Zytostatika zu erhöhen
2. die Behandlungszeit zu verlängern
3. die Wirkung der Zytostatika durch Schutz der Knochenmarkszellen auf die malignen Zellen zu konzentrieren.

Es handelt sich bei diesem Vorschlag also im Grunde um keine reine Chalontherapie, sondern um die Erzielung einer größeren Effizienz der Zytostatika-Therapie. Dabei kommt zustatten, daß es sich beim Granulozytenchalon um ein G_1 -Chalon handelt; d.h., es verhindert das Eintreten des proliferativen Pools des Knochenmarks in die S-Phase durch ein Festhalten in der G_1 -Phase, in der die Zellen gegen Strahlen und andere zytotoxische Einwirkungen bekanntermaßen wesentlich unempfindlicher sind. Der springende Punkt bei diesem Therapiévorschlag ist es, die Chalondosis so einzusteuern, daß die gesunden Zellen maximal in G_1 geblockt bleiben, die malignen Zellen des Gewebes aber noch nicht betroffen werden, einen normalen Zellzyklus durchlaufen und damit für die Zytostatika erreichbar bleiben.

Kritisch muß zu diesem Vorschlag angemerkt werden, daß die Zellproliferation der gesunden Zellen im Knochenmark z.B. leukämischer Tiere durch den Chalonverlust aus peripheren Zellen bereits vermindert ist; die Anzahl der Progenitorzellen ist erhöht aufgrund der Reifungsverzögerung [323]. Diese Einschränkung gilt aber nicht für die übrigen Tumoren, die das Knochenmark nicht betreffen.

Eine gegenüber dem SCHÜTT-Vorschlag verbesserte Methode wird von HOUCK vorgestellt [123] : Für kurze Zeit sollte es möglich sein, so meint HOUCK, durch ausreichend hohe Dosen normale und abnormale Zellen solange zu blocken, bis sich die gesamte Zellpopulation in G_1 befindet. Dann ist der Zeitpunkt gekommen, die Dosis so weit

zu reduzieren, daß nur noch die normalen Zellen gebremst werden. Die Tumorzellen durchlaufen damit in höchstem Maße synchronisiert S -, G₂ - und Mitosephase und sind damit für eine zytostatische Attacke beträchtlich empfindlicher.

Geradezu Überraschende Einsatzmöglichkeiten könnten sich bei der Anwendung des Fibroblastenchalons und des T- und B-Lymphozytenchalons ergeben:

Das Immunsystem der T- und B-Lymphozyten wäre selektiv ausschaltbar; bisher kann man das Immunsystem nur insgesamt unter Inkaufnahme schwerer Nebenwirkungen in seiner Reaktionsfähigkeit abschwächen.

Ein Anwendungsgebiet des Fibroblastenchalons könnte in der Therapie der Leberzirrhose liegen: Die Leberzirrhose als ein im Grunde regenerativer Prozeß führt nur deshalb zu einem schlechten Ergebnis und zum schließlichen Pfortaderhochdruck, weil die Regeneration ungleichmäßig vor sich geht. Die Proliferation des Interlobulargewebes und der Kapillaren geht ungeordneter und schneller vonstatten als die der Hepatozyten und Sinuszellen. Mit Fibroblastenchalon wäre hier eine Synchronisierung zu erreichen.

Bei Psoriasis, bei der die Lebensdauer einer Epidermiszelle nur 3 oder 4 Tage beträgt, beruht die verstärkte Proliferation nicht auf einem verminderten Chalongehalt; Psoriasiszellextrakte waren im Gegenteil noch wirksamer als die normaler Haut, was auf einen sogar erhöhten Chalongehalt schließen läßt [174] . Trotzdem waren Psoriasiszellen auf Epidermischalon empfindlich [61 u. 174] und reagierten in gleicher Weise wie normale Zellen. Für die gesteigerte Proliferation scheinen zwei Umstände verantwortlich zu sein:

1. Der erniedrigte c-AMP-Gehalt der psoriatischen Zellen [177 u. 270b] .
2. Ein Mitosestimulator
 - a) Das Serum von Patienten mit akuter Psoriasis stimulierte die epidermalen Mitosen in vitro, was das Serum von Normal-Patienten nicht vermochte [63] .

- b) Die Chalonwirkung konnte durch Psoriasis-Serum geblockt werden!

Eine Therapie mit Epidermischalon wäre damit bei Psoriasis prinzipiell möglich.

6. Teil Das Dilemma der Chalonforschung

6.1. Technische Schwierigkeiten

6.1.1. Vorbemerkungen

Daß das Chalonkonzept BULLOUGH's teilweise mit Skepsis aufgenommen wurde, hatte seine objektiven Ursachen in bestimmten methodischen Schwierigkeiten; sie liegen überwiegend in der Extraktionstechnik und im Assay-System begründet. Fast in jeder Publikation taucht irgendwo der - fast schon stereotype - Wunsch auf, es möge doch einmal gelingen, die Chalone in ganz reiner Form und in ausreichender Menge zu isolieren; oder zumindest, daß es gelingen werde, einen gültigen Assay zu entwickeln.

"... reason for skepticism is that no chalone has so far been purified and chemically characterized" [87] .

" It is concluded here that there is an outstanding need for a quick, reliable, discriminative test, which does not rely on negative results" [45] .

6.1.2. Die Reindarstellung der Chalone

Die Probleme der Arbeit mit Chalonen und ihrer Reindarstellung scheinen die eines typischen Grenzgebietes zu sein. "Die Schwierigkeit bei der Anwendung und experimentellen Weiterentwicklung des Chalonkonzeptes ist, daß es eine wohl einzigartige Verbindung sophistischer Zellbiologie und sophistischer Eiweißchemie erfordert" (im Original: "a fairly unique marriage of sophisticated cell biology and sophisticated protein chemistry") [123] .

So habe die Isolierung von Chalonen nicht zu einem Reinheitsgrade bewerkstelligt werden können, die die Biochemiker überzeuge; umgekehrt benutzen die Biochemiker Methoden, die von den Biologen nicht anerkannt würden.

Eine Verbesserung der Präparation bedeutet die von MARRS und VOORHEES empfohlene "quality control" [177] des Extraktes: Sie überprüfen elektronenmikroskopisch die Homogenität des Extraktes; die Zellen und Organellen sollen zerstört sein. "Another reason why it has proved so difficult to isolate chalcones could also be that several factors influencing different phases of the cell cycle seem to be present in mitosis - inhibiting extracts made from various tissues" [87]. So auch: [86, 87, 120, 133, 168, 176].

Faktoren, die ebenfalls auf die Proliferationsaktivität inhibitorisch Einfluß nehmen und die Extrakte verunreinigen können, sind:

Nicotinamid [247]

c-AMP [58, 72 u. 99]

Histone [271, 58]

Prostaglandine [5, 99 u. 269b]

Adrenalin [93]

ADACHI [1] beschreibt einen Nicht-Chalon-Inhibitor. Außerdem sind zu erwähnen: Lipidinhibitoren [57].

6.1.3. Das Assay-System

Folgende Methoden, inhibitorische Wirkungen im Zellzyklus nachzuweisen, werden normalerweise angewandt:

1. Colcemid-Methode zur Bestimmung des Mitoseindex.

Mit Hilfe von Colcemid und Vinblastin (Velbe) lassen sich in Teilung befindliche Zellen in der Metaphase für ungefähr vier Stunden arretieren. Aus der Anzahl der in dieser Zeit aufgelaufenen Teilungsfiguren kann man die Geschwindigkeit ermitteln, mit der die Zellen in die Mitose übergehen. Der Mitoseindex gibt die Anzahl Mitosen pro 1000 Zellen an [84 u. 137].

2. Die ^3H -Thymidin-Inkorporation

Mittels dieser Methode läßt sich die Menge der Zellen bestimmen, die aus der G_1 -Phase in die S-Phase eintreten [224]. Man muß allerdings berücksichtigen, daß diese Methode aus verschiedenen Gründen Meßfehler enthalten kann:

Eine Verminderung der ^3H -Thyminidin-Inkorporation kann nämlich auch vorgespiegelt werden, wenn eine Thyminidinphosphorylase das Thyminidin zu Thymin umwandelt und so seiner Verwertung zur DNS-Synthese zuvorkommt [121 u. 277]. Lymphatische Gewebe, aber auch die Leber, enthalten große Mengen an Thyminidinphosphorylase [121 u. 123].

RYTÖMAA und KIVINIEMI zeigten durch Benutzung anderer markierter Substanzen, daß dieser Effekt - zumindest beim Granulozytenchalon - nicht ins Gewicht fällt [219, 220 u. 221]. Hinzu kommt, daß sich in den chalonhaltigen Filtrationsfraktionen nach Gel-Filtrationen keine Thyminidin-Phosphorylase mehr fand [277].

MARKS weist auf eine andere Fehlerquelle hin:

Die Zellmembran oder die Zellkernmembran können in ihrer Permeabilität so verändert sein, daß die Durchsetzung des intrazellulären oder intranukleären Thyminidin-Pools mit markiertem Thyminidin verzögert ist [205]. MARKS meint aber selbst, daß eine solche Möglichkeit rein theoretisch sei und nur ins Kalkül miteinbezogen werden müsse.

Eine wichtige Fehlerquelle erwächst dagegen daraus, daß sich in vielen Geweben "kalte" Nukleotide befinden; daraus resultiert ein Verdünnungsfaktor, der als Hemmwirkung mißdeutet werden kann [10, 121, 204 u. 228].

6.1.4. In vitro - in vivo Systeme: Widersprüchliche Ergebnisse

Unterschiedliche Ergebnisse beim Vergleich in vitro - in vivo existieren eigentlich nur in Bezug auf die (Mit-) Wirkung der Stresshormone. Deswegen scheinen manche Befürchtungen ("The outstanding question remains: is everyone examining the same substance?" [161]) etwas übertrieben zu sein. Zuzustimmen ist jedoch der Ansicht, daß in jedem Fall, in vitro wie in vivo, Studien an einem Mitoseinhibitor eine schwierige Unternehmung seien [161];

in vitro kann eine Veränderung des osmotischen Druckes oder eine Spur toxischer Substanzen zu falschen Ergebnissen führen; in vivo kann die bloße Tatsache, daß die Versuchstiere wach sind, den Ablauf des Zellzyklus verlangsamen.

Konstante experimentelle Bedingungen anzustreben, ist deshalb

eine Voraussetzung für Inhibitorforschung. GOEDEKE erwartet deshalb, daß die in vitro Versuche noch an Bedeutung gewinnen, "da bisher schwer kontrollierbare Faktoren, die über Blutkreislauf und Nervensystem wirken, eliminiert werden und deshalb der Einfluß kontrollierbarer Variabler genau verfolgt werden kann" [99] .

6.2. Von BULLOUGH eingeleitete, im nachhinein als Fehlentwicklungen zu klassifizierende Abschnitt der Chalonforschung

6.2.1. Vorbemerkungen

Die Chalonforschung ist untrennbar mit dem Namen von WS. BULLOUGH verbunden. BULLOUGH hat diese Hemmsubstanzen entdeckt und sie als Chalone bezeichnet; er hat diese anfänglich mehr stagnierende als Furore machende neue Disziplin der Inhibitorforschung vorangetrieben; er hat andere Wissenschaftler interessiert und den Pharmakonzern Organon als Mäzen gewonnen; er hat nicht zuletzt das Chalon charakterisiert und seine Eigenschaften definiert.

Aber auch eine ganze Reihe unfruchtbarer Entwicklungen und Fehlschläge sind mit BULLOUGH's Namen verknüpft. Dazu gehörte jedoch nicht, den Chalonen den Anspruch zuzuordnen, gewebsspezifisch zu wirken. Dies muß vielmehr als die entscheidende Leistung BULLOUGH's angesehen werden und trennt die Chalone geradezu von zytotoxischen und sonstigen unspezifischen Substanzen ab.

6.2.2. Einführung des G_2 -Mitose-Assays

Ganz gewiß war die Verwendung des G_2 -Mitose-Assays zur Nachprüfung der Chalonwirkung und vor allem seine Auslegung durch BULLOUGH ein Vorgang, der aus heutiger Sicht zumindest als unglücklich bezeichnet werden muß.

Zwar mag es so gewesen sein, daß zu jener Zeit (1959) die Radionuklidmethode noch in den Kinderschuhen steckte (radioaktive Markierungsmethoden wurden jedoch bereits im Jahre 1951 angewandt [245]); dies rechtfertigt jedoch nicht den einfachen Rückschluß von G_1 -Wirkung anstelle G_2 -Wirkung.

Die gründliche Revision der Vorstellung zur G_2 -Wirkung der Chalone drückt sich darin aus, daß MARKS [173] schließlich vom G_1 -Chalon als dem eigentlichen Chalon sprechen konnte.

6.2.3. Die Rolle der Stresshormone

Eine zweite Fehleinschätzung BULLOUGH's war die Verknüpfung der Stresshormone mit der Chalonwirkung; BULLOUGH nahm bekanntlich die Bildung eines Chalon-Adrenalinkomplexes an. Die Feststellung, daß Chalone zur Ausübung ihrer vollen Wirksamkeit die Anwesenheit von Stresshormonen benötigen, wurde sogar zum entscheidenden Merkmal aufgebaut ("discriminative test"). In vitro Versuche schienen diese Ansicht zwar zu bestätigen, in vivo aber war der discriminative test jedoch nicht mehr haltbar. Auch war verschiedentlich bewiesen worden, daß Adrenalin selbst antimitotische Potenz besitzt (siehe Kapitel 2.3.4.); BULLOUGH war vom Gegenteil ausgegangen. Im übrigen konnte die Wirkung des Adrenalin lediglich bei Anwendung des G_2 -Assays demonstriert werden.

6.2.4. Konstruktion der Freien Diffusion der Chalone

Als dritter Punkt muß BULLOUGH's Konstrukt der Freien Diffusion der Chalone genannt werden.

"Wenn ein solches epidermales Chalon die eigentliche Kontrollsubstanz in einem epidermalen Feedback-Mechanismus ist, setzt dies voraus, daß es sich um einen Stoff handelt, der durch freie Diffusion von Zelle zu Zelle wandern kann, daß dieser Stoff ständig produziert und eliminiert wird und daß die mitosehemmende Wirkung desselben gewebsspezifisch sein muß" [137]. Diese Äußerung IVERSEN's noch aus dem Jahre 1968 macht klar, warum das Merkmal der freien Diffusion sich so lange halten konnte: Es paßt besonders gut in die kybernetische Konzeption, die den Chalon untergelegt worden war. Der Denkfehler, der zum Konstrukt der Freien Diffusion führte, war BULLOUGH schon bei der theoretischen Auswertung seines Wundversuches unterlaufen [25 u. 26]. Die Entfernung eines Gewebstückes hat - so BULLOUGH damals - eine Abnahme der Chalonmenge im Gewebe zur Folge; daraus sei - im Wege des negativen Feedback - die einsetzende Wundregeneration zu erklären.

Die Prämisse (Abnahme der Chalonmenge durch die Gewebsentfernung) ist zwar richtig; es muß jedoch beachtet werden, daß die Chalonkonzentration in den zurückbleibenden Zellen unverändert bleibt.

Auch ARGYRIS fragt: "Is in fact, the local loss of tissue mass sufficient to result in a decrease in the concentration of chalones?" [5] .

Das bedeutet, daß bei Verwundungen über die Chalone keine Information an die restlichen Gewebszellen erfolgen kann, daß das Gesamtgewebe abgenommen hat.

Exkurs: Die Proliferationsauslösung stellt man sich heute deshalb etwas anders vor; die Anhäufung und das Freiwerden größerer Mengen Glykogen [270b] sollen dabei ebenso bedeutsam sein wie das Serum-Mitogen, das die Fibroblasten zur Proliferation anregt [122] .

Es ist richtig, daß die Zellen in der Nachbarschaft der Wunde proliferieren; und zwar über eine Distanz von 300 Zellen, was einem mm entspricht [33] . Daß dieser Vorgang auf einen Chalonerlust in diesen Zellen zurückgeht, ist reine Spekulation, auch wenn BULLOUGH zum Beleg eine eigene Veröffentlichung zitiert [34] . BULLOUGH gibt für diese Zellen kurzerhand eine um 50 % abgesunkene Chalonzkonzentration an: Es ist aber bisher keine Methode bekannt, mit Hilfe derer man Chalonzkonzentrationen messen kann. Aus drei anderen Gründen hätte das Konstrukt der Freien Diffusion schon bald revidiert werden müssen:

- 1 Wegen des gleichzeitigen Postulats der Gewebsspezifität. Wenn frei diffundierende Substanzen angenommen werden, ist nicht ganz einzusehen, warum diese sich an die Grenzen eines Gewebes halten sollen. Mit anderen Worten: In jedem Gewebe ist zwar nur das spezifische Chalon wirksam, aber auch alle anderen Chalonsarten müßten gefunden und gewonnen werden können. Dies ist aber nicht der Fall. Chalons werden stets nur in dem Gewebe gefunden, in dem sie produziert werden und auf das sie wirken.
2. Mit der Bestimmung des Molekulargewichts. Für das Epidermale Chalon wurde ein Molekulargewicht von 30000 bestimmt; in dieser Größenordnung ist ein freies Diffundieren durch Membrangrenzen nicht mehr vorstellbar. Das Granulozytenchalon (MG 3000) ist demgegenüber unter Umständen frei diffusibel.

3. Mit der Entdeckung der G_1 -Chalone der Epidermis.

Das Prinzip der Rückdiffusion (von den differenzierten Zellen zu den proliferierenden Basalzellen) war für die G_1 -Chalone nicht mehr sinnvoll und erforderlich. ELGJO zeigte dann, daß die differenzierten Zellen ein G_1 -Chalon und die undifferenzierten Zellen der Haut (Basalzellen) ein G_2 -Chalon produzierten.

Eigentümlicherweise wurde das Prinzip der Freien Diffusion aber selbst dann nicht aufgegeben, als festgestellt wurde, daß das Epidermale Chalon eine semipermeable Membran nicht passieren kann. Dieses Paradoxon liest sich im Wortlaut so: "... It is already known that although the epidermal chalone cannot pass through a semipermeable membrane, it does pass from cell to cell within the epidermis and across the dermis" [34] .

Später wurde vom Prinzip der Freien Diffusion nicht mehr viel vernommen. Inzwischen bezieht sich BULLOUGH auch etwas anders auf den Wundversuch: Durch die Verwundung nehme die Chalonkonzentration in den angrenzenden Zellen auf die Hälfte des normalen Wertes ab, was durch eine erhöhte Zellpermeabilität zustande komme.

Freilich ist die "Freie Diffusion" nicht als ein schwerwiegender Fehler aufzufassen; schon deshalb nicht, weil die kybernetische Theorie der Wachstumsregulation, auf der die Chalontheorie fußte, damit recht gut verständlich zu machen ist.

6.2.5. Chalone als "Jungbrunnen"?

Ein vierter Mißgriff BULLOUGH's ist zwar ebenso peinlich wie nebensächlich; er deutet aber darauf hin, daß voreilige Schlüsse zu ziehen vielleicht eine Eigenart BULLOUGH's ist.

BULLOUGH gab nämlich allen Ernstes bekannt, daß man mit Chalonen - über die Verlangsamung des Zellzyklus - vielleicht sogar das Leben zu verlängern imstande sei [42] , eine Spekulation, die ihm natürlich Spott und beißende Kritik einbrachte [282] .

6.2.6. Voreilige Schlüsse

Eine vielleicht verständliche, doch nicht immer zum Positiven gereichende Eigenschaft BULLOUGH's war es, die Bedeutung der Chalone überaus stark zu forcieren:

Bezüglich ihrer Rolle in der Wachstumsregulation, bezüglich ihrer Rolle bei der Carcinogenese und bezüglich ihrer Möglichkeiten bei der Tumorthherapie.

Bereits 1969 erschien, wie bereits mehrfach erwähnt, eine Serie von vier Veröffentlichungen in "Nature " unter dem zusammenfassenden Motto "Chalones and Cancer". Zwei der Arbeiten stammten von BULLOUGH. Er schreibt: "The question now obviously arises whether such chalones may be of practical value in cancer chemotherapy to arrest or even to reverse tumour growth" [37] .
"Thus the results could have relevance to human tumour therapy" [41].
Überlegungen, die mit mitosebremsenden Mitteln allein metastasierende und invasiv wachsende Tumoren geheilt werden könnten, werden von ihm an dieser Stelle nicht angestellt; BULLOUGH muß sich deshalb den Vorwurf des Spekulierens gefallen lassen.
Natürlich - das muß man eingestehen - blieb BULLOUGH vielleicht keine andere Wahl, als seine Ergebnisse etwas reißerischer aufzumachen, allein aus dem Bestreben heraus, seine Forschungen rein materiell fortsetzen zu können: Speziell für eine Pharmakonzern sind Aussichten auf einen schnellen praktischen, therapeutischen Einsatz sicherlich ein starker Anreiz zur Investition von Geldmitteln.

6.3. Der Absolutheitsanspruch der Chalone in Bezug auf die Wachstumsregulation

Um zu einer gerechten Beurteilung und Einschätzung der Chalone zu kommen, braucht man nicht wie IVERSEN und ARGYRIS grundsätzlich anzuzweifeln, ob sie wirklich zur "Inneren Sekretion " zählen und ob ihre Wirkung sich mit der im Experiment beobachteten deckt.

Der Absolutheitsanspruch, wie er für die Chalone einmal bestanden hat ("A considerable amount of evidence exists to suggest that the mass of tissue can be controlled solely by means of a negative feedback mechanism and that such a mechanism actually exists" [45]), muß aber sicherlich zurückgenommen werden zugunsten einer flexibleren Anschauung ("Developmental and compensatory growth of animal organs is too complex to be explained solely in terms of the homeostatic regulation of cell division by chalones" [244]) .

Die Entdeckung von Nicht-Chalon-Inhibitoren sollte deshalb wie R. MARKS schreibt nicht mit Überraschung aufgenommen werden (siehe auch Kapitel 6.1.2.).

Exkurs: Stimulatoren des Wachstums

Es ist immerhin erstaunlich, wie gründlich die gesamte Literatur der Wachstumsfaktoren von der Chalonforschung übersehen worden ist (Ausnahme: R. MARKS [176], der eine Arbeit von KARASEK und CHARLTON erwähnt, u. F. MARKS [173] mit einem Hinweis auf epidermale Wachstums-substanzen [256b]). Dabei ist die chemische Charakterisierung und Wirkungsweise dieser Substanzen z.T. sehr weit fortgeschritten (der nerve growth factor, dessen Primärstruktur inzwischen aufgeklärt wurde, stimuliert allerdings nur das Auswachsen von Neuriten, d.h., eine Ausdifferenzierung der Zelle [21a]). Allem Anschein nach müssen wir den Growth Factors eine Rolle bei der altersmäßigen Entwicklung des Organismus zuweisen: So ist der EGF (Epidermal Growth Faktor) in der Lage, bei neugeborenen Mäusen die Lidspalten-Bildung und- Öffnung zu beschleunigen [71]. Chalone wirken zwar ebenfalls bereits auf embryonale Zellen, jedoch noch nicht in streng gewebsspezifischer Weise [184]. Ihre eigentliche Funktion bekommen sie wohl erst in reiferem Gewebe. So wie es bei der Balance der Erythropoese eine ganze Skala von Ereignissen gibt, auf die sich der Körper einstellen muß (z.B. Höhenanpassung, große Blutverluste, Menstruationsblutung usw.), wirken auch auf alle anderen Organe Umstände ein, die flexibel und suffizient beantwortet werden müssen. Für das Knochenmark nimmt KIVINIEMI [147] an, daß die erythropoetinabhängigen Mechanismen, also die Umwandlung von pluripotenten Stammzellen in solche der roten Reihe, nur in schwersten Fällen zum Tragen kommen.

Beispiele für stimulatorisch wirksame Substanzen in anderen Zellverbänden sind:

Der Colony stimulating factor, der in vitro Kolonien von Granulozyten und Makrophagen zum Wachstum anregt und als Granulopoetin eingeschätzt worden ist [143];
der lymphocyte stimulating factor [100];

der Makrophagen stimulierende Faktor [191] .

TEIR et al. [253] berichten, daß bei der Autolyse von Leber-, aber auch von anderem Gewebe, gewebsspezifische, nicht speziesspezifischer Faktoren freigesetzt wurden, die die Proliferationsaktivität in den betreffenden Geweben verstärken;

Fettsäuren führen zu einem Mitoseschub der Leber [238] ; Histamin stimuliert die Mitosetätigkeit wahrscheinlich über die Hydrolyse von c-AMP;

Prostaglandine können ebenfalls die Mitose einleiten, FRANKS hält sie sogar für Wundhormone [95] .

KARASEK u. CHARLTON [142] beschrieben einen Wachstumsstimulator, der aus Fibroblasten abgesondert werden soll. HOUCK [122] konnte ein Serum-Mitogen isolieren, welches Fibroblasten stimuliert und offensichtlich mit dem Fibroblastenchalon am gleichen Rezeptor konkurriert [126] .

Auch aus weiteren Untersuchungen ist bekannt, daß Fibroblasten für ihre Vermehrung zwingend Serum benötigen [208] .

Schon RYTÖMAA [222] vermutete ja Antichalone, die allerdings der Dermis entstammen sollten. Ohne das Antichalon bekommt das Chalon nach seiner Theorie ein Übergewicht; Bei Ablösung der Epidermis von ihrer Unterlage sollen die Mitosen zum Stillstand kommen [241] ; das Gegenteil ist allerdings weit besser belegt [196] . Weiterhin soll durch Antichalone die "regional specificity" des Epidermalen Chalons bedingt sein.

6.4. Vorschlag: Die Rolle der Chalone im System der Wachstumsregulation

Meines Erachtens muß die Funktion der Chalone nach Gewebsarten differenziert werden:

1. Das Knochenmark-Blutzellen-System
2. Die kompakten Gewebe.

Zu 1. Diesem System kommt das ursprüngliche Chalonkonzept, so wie es für die Epidermis einmal formuliert worden ist, aus verschiedenen Gründen am nächsten.

Die ausgereiften Zellen erzeugen im Blut eine Chalonkonzentration, die dem vorhandenen Zellpool proportional ist;

aus den Zellen heraus baut sich also im Blut eine gleichmäßige - gewissermaßen durch "Freie Diffusion" ins Blut zustande gekommene - Chalonekonzentration auf, die im "proliferative compartment", also im Knochenmark, Zellregeneration und Zellersatz bis zu einer gewissen Größenordnung reguliert.

Da die Zellen hier keinen Kontakt miteinander haben - die Entfernung zum Knochenmark ist beträchtlich - kommt eine Wachstumsregulation auf anderem als auf chemischem Wege für diese Zellen kaum in Betracht (neuerdings hat jedoch POPP [206b] auch für diesen Fall eine Wachstumsregulation auf physikalischem Wege plausibel gemacht).

- Zu 2. Bei kompakten Geweben dagegen kommt für die Wachstumsregulation auch ein Mechanismus in Frage, wie er durch Zellkontakt möglich ist und oben bereits beschrieben wurde (siehe Kapitel 4 2.3.2.).

Ein Rückkopplungsmechanismus, der sich am Blutspiegel der Chalone orientiert, wäre für kompakte Gewebe ein äußerst umständliches und ungenaues Verfahren. Das Blut mit seinem recht großen Volumen von fünf Litern und mehr, das z.T. in Depots gespeichert wird und dessen Gesamtmenge durch diverse Mechanismen kurzfristig beeinflusst werden kann (Flüssigkeitsaufnahme, Durst), weist zu viele Unsicherheiten für eine exakte Gewebsregulation derjenigen Zellsysteme auf, die nicht selbst zum Blut als integraler Bestandteil hinzugehören.

Zwar ist im Blut ein sehr geringer Chalonspiegel eines jeden Chalons vorhanden; dieser kann jedoch nur bei größeren Gewebsverlusten erheblich werden. Bei Teilhepatektomien der Leber, die mehr als 10 % des Gesamtgewebes betragen, tritt nicht nur eine lokale Proliferation an den Schnittebenen, sondern ein Proliferationsschub der gesamten Leber ein.

Es erhebt sich die Frage, warum die Kontaktinhibition nicht unmittelbar über die Membranrezeptoren, sondern mittelbar unter Zwischenschaltung der Chalone zustande kommt.

Hierzu wäre folgende Hypothese möglich:

Der Organismus muß auch für solche Fälle von Gewebsverlust Erkennungssysteme bereithalten, die zunächst nicht als solche imponieren, weil die Zellen zwar geschädigt, aber noch im Gewebsverband eingeschlossen sind. Durch toxische oder mechanische Einwirkung kann die Zelle z.B. so stark geschädigt werden, daß sie in einem pränekrotischen Zustand übergeht; ein Reststoffwechsel mag noch vorhanden sein, eine Erholung ist jedoch nicht mehr möglich. Es handelt sich dann um einen larvierten Zellschaden; der Reststoffwechsel reicht nicht mehr aus, den Nachschub des normalen Chalon-Turnover zu produzieren: Die gesunden Nachbarzellen werden dadurch zur Mitose angeregt. PINKUS [206a] beschreibt eine auf mechanischem Wege entstandene Schädigung dieser Art: Durch ein mehrmaliges Schaben an der Epidermis mittels eines Zellophanstreifens kam eine Epidermisproliferation unter der betreffenden Stelle zustande; dies geschieht, obwohl noch nicht einmal histologisch Anzeichen für eine Verletzung vorliegen. Hier wäre es vorstellbar, daß die Zellmembranen mechanisch so beansprucht wurden, daß das Chalon sich von den Rezeptoren lösen konnte; vielleicht erfolgt aber auch eine rezeptorische Permeabilitätssteigerung der Zellen.

Den Chalonen sind also je nach Zellverband unterschiedliche Aufgaben zuzuordnen:

Bei den suspendierten Zellverbänden, also den Blutzellen, untersteht ihnen der normale Zellersatz und kleinere Fälle von Zellregeneration. Erst bei größeren Verlusten wird die Potenz der verschiedenen Postine herangezogen.

In kompakten Geweben wird der im Blut befindliche Chalonanteil ganz im Gegensatz zu den suspendierten Zellsystemen nur bei großen Verlusten bedeutsam werden. Wichtiger scheint hier seine Rolle bei der Erkennung von larvierten Zellschäden und Nekrosen zu sein.

Die Unterschiede der beiden Gewebsgruppen drücken sich auch im Molekulargewicht der betreffenden Chalone aus: Gering (bis 10000) bei den Blutzellen, wesentlich höher bei den kompakten Geweben.

6.5. Die Bedeutung der Zellmembranen

Besonders bei den kompakten Geweben muß der Zellmembran eine entscheidende Rolle im Chalonssystem zugebilligt werden:

"There is general agreement that chalone activity somehow depends on the state of cellular membranes, but the nature of this link is unclear" [182]. Der Epidermale G_1 -Inhibitor scheint geradezu ein Bestandteil der Zellmembran zu sein. Er besteht, wie bereits erwähnt (Kapitel 4.1.4.), aus einem inaktiven Proteinmantel und einem ziemlich kleinen aktiven Kern, der nach proteolytischer Andauung aus dem Mantel freigesetzt wird. "This might be taken as evidence, admittedly speculative, that the factor is of membranous origin or that it is bound to cell structure" [173].

Die Zellmembran scheint auch bei der Carcinogenese eine entscheidende Funktion zu haben:

RUBIN [217] ist der Auffassung, daß maligne Transformation aus einer Zerstörung der Verteilung und Konfiguration der Zelloberflächenstruktur resultiert;

MARKERT und URSPRUNG [166] beschreiben "neoplasia as a disease of membranes".

KLEIN [149] nimmt an, daß die Membran der malignen Zelle so verändert ist, daß keine immunologische Reaktion mehr zustande kommen kann.

Umgekehrt mag, wie BULLOUGH [35] vermutet, eine Verminderung der Zellpermeabilität für die antimetabolische Wirkung der Glucocorticoide verantwortlich zu sein. Auf carcinogenvorbehandelte Haut übt Cortison keine Wirkung mehr aus [112].

6.6. Gewebsspezifität der Chalone im Zweifel: Die verunsicherte Situation der Chalonforschung

Trotz mancher Veränderungen des Chalonkonzeptes im Laufe der Zeit konnte es doch nur einmal in eine ernsthafte Krise gestürzt werden. Diese Krise hält m.E. zur Zeit noch an; sie ist verursacht durch einen Angriff auf das essentielle Merkmal der Gewebsspezifität.

Die Einwände scheinen zwar bei detaillierter Betrachtung als nicht stichhaltig; trotzdem finden sie anscheinend höchste Be-

achtung. Dies ist dem Umstand zuzuschreiben, daß zwei Autoren an eigenen früheren Veröffentlichungen Selbstkritik üben [191a, 191b u. 266].

Wenn dieser Schritt von einem Autor getan wird, müssen, so wird man allgemein annehmen, zu eindeutige Argumente dazu geführt haben. Die beiden "zurückgezogenen" Arbeiten befaßten sich mit folgenden Themen:

1. Mit der gewebsspezifischen Wirkung des Hautextraktes, berichtet von MOHR im Jahre 1968 [189] .
2. Mit der Gewebsspezifität der Leberchalone, berichtet von VOLM im Jahre 1969 [264] .

Mit der Veröffentlichung MOHR's hatten wir uns bereits im Kapitel 5.2.3.5.2. mit eindeutiger Stellungnahme beschäftigt.

Zu den verschiedenen Publikationen VOLM's et al., die auf die "non-existence" eines Leberchalons [266] abzielen, muß gesagt werden, daß auch sie keine wirklich neuen Ergebnisse enthalten. Daß mit dem groben Leberextrakt auch Nierengewebe inhibitorisch beeinflusst werden kann, war bereits bekannt. Dies hatte VOLM bereits bei seiner ersten Untersuchung [264] vermerkt und durch weitere Versuche durch Carcinogene gefunden, daß die spezifischen Substanzen durch unspezifische Hemmsubstanzen "maskiert" sind. Dieser Befund wird durch die spätere "Selbstkritik" in keiner Weise entkräftet; zumal VERLY [259] durch Entwicklung stark verbesserter Isolierungsmethoden die Nebenwirkung auf das Nierengewebe bis auf einen statistisch unsignifikanten Wert drücken konnte, - sodaß völlig unklar bleibt, woraus sowohl VOLM als auch MOHR ihre schwerwiegende Meinungsänderung überhaupt ableiten. Trotzdem zeigten die Vorgänge - wegen des erwähnten spektakulären Umstands der Selbstkritik - natürlich Wirkung. Der Begriff Chalone wird von nun an wesentlich vorsichtiger benutzt:

PAUKOVITS spricht lieber vom "Granulopoese-inhibitierenden Faktor (GIF)" [202] und vom "specific inhibitor (chalone)" [201] .

ROHRBACH formuliert "M-factor (chalone)" [213] .

ELCJO überschreibt [88] : "Epidermal growth inhibitors (chalones) in dermis and serum", und selbst F. MARKS, sonst ein engagierter Verfechter der Chalone, überschreibt einen Artikel: "Ein chalone-artiger Hemmstoff für die DNA-Synthese [161] .

6.7. Schlußbemerkungen

Die Chalone sind, insgesamt gesehen, sicherlich keine "einfache Hypothese" im Sinne von LAURENCE [244], eher waren sie von Anfang an zu stringent definiert. Die Chalonforschung mußte deshalb manchen Umweg gehen (Stresshormone, G_2 -Assay!).

Jedoch, auch das sollte man bemerken, ohne die Verwicklung der Stresshormone in das Chalonkonzept wäre die mögliche Interaktion der Chalone (zumindest der G_2 -Chalone) mit dem c-AMP nicht erkannt worden! Neurdings wird dieser Zusammenhang aber wieder bezweifelt (MARKS, pers. Mittlg).

Wie der Psychoanalytiker FROMM sinngemäß einmal bemerkte, ist das wichtigste an einer Theorie zunächst nicht, daß sie "stimmt", sondern daß sie produktiv - also eine gute Arbeitsgrundlage - ist ("produktive Irrtümer").

Zur Zeit sind folgende Fragen offen:

1. Können die Chalone wirklich die wesentliche Rolle bei der Zellregeneration und Wachstumsregulation spielen?
2. Ist die Wirkung der Chalone wirklich bloß hemmend, oder ist sie nicht vielmehr aktiver einzuschätzen, etwa im Sinne einer Steuerung der Zellreifung und - differenzierung?

KIVILAKSO [147] vermutete bereits 1970: "The proliferation of mitosis is only a secondary outcome of this action" [160 u. 162]. Auch PAUKOVITS [160], LAURENCE [203] und BULLOUGH [32] äußerten sich bereits in diesem Sinne.

3. Aus der Reifungsfunktion würde zwingend eine Chalonwirkung in der G_1 -Phase des Zellzyklus resultieren und zu fordern sein. Wenn auch ein Angriff in dieser Phase, wie oben ausgeführt, als wahrscheinlicher gilt, haben wir bisher sowohl G_1 - als auch G_2 -inhibitorische Wirkungen als chalonbedingt angesehen, soweit sie gewebsspezifisch waren.

Bedeutsam wird das Problem nur für Zellarten, die eine ins Gewicht fallende G_2 -Population aufweisen. Dies scheint längst nicht für alle Gewebe zuzutreffen (die meisten Zellen erfüllen jedenfalls ihre Gewebefunktion in G_1 !) Welches Chalon soll nun als das "eigentliche" Chalon angesehen werden ?

Je nachdem, wie diese Fragen einmal beantwortet werden, wird die Zuordnung der Chalone zur Unmenge der biologischen Substanzen und ihre Wertigkeit darin anzusetzen sein.

So stimmen wir abschließend WS. BULLOUGH zu, wenn er sagt:

"There has been a general but cautious acceptance of the negative feedback theory",

aber auch EDNA B. LAURENCE, die sich so äußert:

" That epidermal chalone exists is incontrovertible. It's rightful place in the histology of epithelia is probably still obscure".

Zusammenfassung

Die Entdeckung der Chalone ging aus der Zellregenerationsforschung an Wunden hervor; das dazugehörige theoretische Konzept wurde aus kybernetischen Ansätzen heraus entwickelt. Zunächst versuchten wir zu zeigen, wie sich die Hinweise auf eine Mitwirkung kybernetischer Momente in der Wachstumsregulation häuften und die Entwicklung nach der Entdeckung von Hemmsubstanzen auf die Formulierung des Chalonkonzeptes hinsteuerte. Wir versuchten weiterhin klarzumachen, daß eine "humorale" Wachstumsregulation aus Gründen der Praktikabilität gewebsspezifisch zu sein hat, um eine "Mitreaktion" anderer Gewebe unmöglich zu machen. Die Charakterisierung der einzelnen Chalone erfolgt neben dem Merkmal der Gewebsspezifität durch die Darstellung der Speziesunspezifität, der Reversibilität der Wirkung und das Fehlen von Zytotoxizität. Die lange Zeit für eine gesicherte Tatsache gehaltene Mitwirkung der Stresshormone wird kritisch abgehandelt und als ein Irrweg der Chalonforschung dargestellt.

Doch konnten wir andererseits bei Überprüfung der widersprüchlichen Ergebnisse in der Frage der Stresshormone wahrscheinlich machen, daß der Verwirrung wohl die Funktion des zyklischen AMP zugrunde liegen könnte: Sowohl Stresshormon- als auch Chalonwirkung werden über dieselbe Substanz (c-AMP) umgesetzt, so daß durchaus überlappende Wirkungen entstehen können. Auf diese Weise hätte sich aus dem "Irrweg" gewissermaßen als Nebenprodukt die Frage der weiteren Umsetzung der Chalonwirkung in der Zelle etwas aufgeheitert; jedenfalls was das G_2 -Chalon betrifft.

Obwohl BULLOUGH die Hemmwirkung der Chalone mit einem G_2 -Assay zur Darstellung brachte und sie nachweislich auch als G_2 -Inhibitoren betrachtete, konnte inzwischen für fast alle Chalone auch eine G_1 -Wirkung nachgewiesen werden. Daraus erwächst die Frage, ob es sich jeweils um ein und dieselbe Substanz handelt. Für das Aszites-Chalon und die Epidermis ist klargestellt, daß es unterschiedliche Substanzen sind.

Vieles spricht dafür, daß ein physiologischer Inhibitor des Zellzyklus in der G_1 -Phase angreifen sollte, daß das G_1 -Chalon mithin wesentlicher ist. Ohnehin scheinen manche Zellsysteme ganz ohne G_2 -Chalon auszukommen (Blutzellreihen).

Es ergibt sich damit eine umgekehrte Situation wie noch vor einigen

Jahren: Während die besondere Bedeutung des G_1 -Chalons im Grunde nicht mehr umstritten ist, gibt nun die Funktion des G_2 -Chalons einige Rätsel auf.

Weiterhin konnten wir zeigen, daß bezüglich des innergeweblichen Verhaltens der Chalone und des Wirkortes der Chalone an der Zelle bei genauerer Betrachtung verschiedene Theoriebildung feststellbar sind:

Bezüglich des innergeweblichen Verhaltens der Chalone unterscheiden wir nunmehr eine Theorie der Freien Diffusion und eine Theorie der Intrazellulären Konzentrierung sowie eine dritte, die aus Elementen der beiden ersten zustande kommt;

bezüglich des Wirkortes der Chalone unterscheiden wir die Gen-suppressionstheorie und die Rezeptortheorie respektive Kontakthemmungstheorie.

Gegenwärtig besonders verbreitet sind die Rezeptortheorie und die Theorie der Intrazellulären Konzentrierung; bemerkenswerterweise lassen sich beide Theorien nicht verknüpfen. Die Frage, wie bei intrazellulären Konzentrierung das Chalon an den auf der Membran gelegenen Rezeptor gelangt, bleibt unbeantwortet.

Schließlich haben wir uns mit der möglichen Bedeutung der Chalone bei Carcinogenese und Tumorwachstum beschäftigt. Besonders hervorzuheben ist die offensichtliche Interaktion der Chalone mit verschiedenen Carcinogenen; hier scheinen eindeutige Zusammenhänge zu bestehen.

Auch das Sigmawachstum der Tumoren kann mit dem nachweisbar beträchtlichen Chalonverlust in Verbindung gebracht werden. Theoretische, und ganz sicher nicht unberechtigte, Einwände gegen die Erfolgsaussichten der Chalonthérapie gerade bei malignen Tumoren werden relativiert durch die Heranziehung des aus pathologischen Lehrbüchern bekannten Umstandes, daß Tumoren den Grad ihrer Bösartigkeit durchaus verändern können; überdies ist Malignität ein Prozeß, der über fließende Zwischenstadien durch allmähliches Voranschreiten zustande kommt.

Auch muß am Schluß die Frage offen bleiben, welche Prognose dem Chalonkonzept zu stellen ist.

Die Palette der Beurteilung des Chalonkonzeptes umfaßt äußert "giftige" Äußerungen [282] und ablehnende Sentenzen ("chalone theory cannot be considered to be of general applicability" [266]);

"Chalones-possibly a horse" [281]

ebenso wie euphorisch-optimistische

"Chalone vermutlich Schlüsselsubstanzen" [161]

"the implication from the in vitro results with rat in that cures of leukemia may also be obtained in man" [225]

und zurückhaltend-realistische

"... scheint es zweifelhaft, ob sich die am Modell der Epidermis entwickelte Vorstellung einer Wachstumskontrolle ohne weiteres auch auf andere Gewebe übertragen läßt, wie heute vielfach angenommen wird" [265]

"only when these techniques are developed and pure chalones are available for study, says an National Cancer Institute official, will it be possible, to assess the true significance of chalones" [182] .

Die Perspektive einiger außerordentlich frappierender Einsatzmöglichkeiten (siehe Kapitel 5.2.4.) bei ausreichender Verfügbarkeit macht die Beschäftigung mit Chalonen keineswegs überflüssig; aufgrund der technischen Schwierigkeiten wird eine stürmische Entwicklung auf diesem Gebiet vorerst nicht zu erwarten sein.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1. K. ADACHI:
A New Endogenous Inhibitor for Mouse Melanoma Cells
Biochemical and Biophysical Research Communications
45, 742, 71.
2. CARL-ERICH ALKEN:
Leitfaden der Urologie
Georg Thieme Verlag Stuttgart 1973.
3. DO. ALLEN, J. MUNSHOWE:
Regulation of Adenyl - Cyclase in Hepatomas of Different
Growth - Rates
Cancer Research 31, 557, 1971.
4. TS. ARGYRIS:
Hair Growth in Skin Grafts Placed on Hairless Mice
Anatomical Record 168 , 457, 1970.
5. TS. ARGYRIS:
Chalones and the Control of Normal, Regenerative, and
Neoplastic Growth of the Skin
American Zoologist 12, 137, 1972.
6. HP. BADEN, S. SVIDOLKA:
The Effect of Chalone on Epidermal DNA Synthesis
Experimental Cell Research 50, 644, 1968.
7. RR. BAKER, CF. GRAY:
Management of Recurrent Squamous Cell Carcinoma after Compo-
site Resection
American Journal of Surgery 112, 558, 1966.

8. R. BASERGA:
Mitotic Cycle of Ascites Tumour Cells
Archives of Pathology 75, 156, 1963.
9. HB. BENESTAD, IG. IVERSEN:
Macrophage Proliferations in Leukocyte Populations from
Rat Blood and lymph during Immune Responses
Scand. Journ. Haematol. 8, 44, 1971.
10. HB. BENESTAD, T. RYTÖMÄÄ:
The Cell Specific Effect of the Granulocyte Chalone De-
monstrated with the Diffusion Chamber Technique
Cell and Tissue Kinetics 6, 147, 1973.
11. FD. BERTALANFFY, C. LAU:
Rates of Cell Division of Transplantable Malignant Rat
Tumours
Cancer Research 22, 627, 1962.
12. P. BICHEL:
Tumour Growth Inhibiting Effect of JB-1 Ascitic Fluid
I. An in vivo Investigation
European Journal of Cancer 6, 291, 1970.
13. P. BICHEL:
Autoregulation of Ascites Tumour Growth by Inhibition of
the G-1 and G-2 Phase
European Journal of Cancer 7, 349, 1971.
14. P. BICHEL:
Feedback Regulation of Growth of Ascites Tumours in Para-
biotic Mice
Nature 231, 449, 1971.
15. P. BICHEL:
Specific Growth Regulation in Three Ascitic Tumours
European Journal of Cancer 8, 167, 1972.

16. P. BICHEL:
Self - Limitation of Ascites Tumour Growth: A Possible
Chalone Regulation
National Cancer Institute Monographies Bd. 38, S. 197, 1973.
17. RE. BILLINGHAM, WK. SILVERS:
Studies on the Conservation of Epidermal Specificities of Skin
and Certain Mucosas in Adult Mammals
Journal of Experimental Medicine 125, 429, 1967.
18. RE. BILLINGHAM, WK. SILVERS:
Dermoepidermal Interactions and Epithelial Specificity
IN: Epithelial - Mesenchymal Interactions, herausgegeben von
R. Fleischmajer und RE. Billingham, Baltimore, 1968.
19. RE. BILLINGHAM, WK. SILVERS:
A Biologist's Reflection on Dermatology
Journal of Investigative Dermatology 57, 227, 1971.
20. IS. BISHAI, MA. MOSCARELLO:
Dimethylbenzanthrene Binding to Epidermal Chalone
Nature 232, 114, 1971.
- 21a. V. BOCCHINI:
The Nerve Growth Factor. Amino Acid Composition and Physio-
chemical Properties
European Journal of Biochemistry 15, 127, 1970.
- 21b. W. BORN, R. BICKHARDT:
Zur Regelung des Zellnachschiebs in der Epidermis
Klinische Wochenschrift 46, 1312, 1968.
22. HD. BROWN:
Activity in Morris Hepatomas 7777; 7794 A, 9618 A
Cancer Research 30, 123, 1970.

23. HR. BROWN:
The Growth of Ehrlich Carcinoma and Crocker Sarcoma Ascitic Cells in the same Host
Anatomical Record 166, 283, 1970.
24. WS. BULLOUGH, EB. LAURENCE:
A Technique for the Studies of Small Epidermal Wounds
Brit. Journ. Experiment. Path. 38, 273, 1957.
25. WS. BULLOUGH, EB. LAURENCE:
The Control of Epidermal Mitotic Activity in the Mouse
Proceedings of the Royal Society, London (B) 154, 540, 1961.
26. WS. BULLOUGH:
The Control of Mitotic Activity in Mouse Skin Experimental Cell Research 21, 394, 1960.
27. WS. BULLOUGH, EB. LAURENCE:
Stress and Adrenaline in Relation to the Diurnal Cycle of Epidermal Mitotic activity in Adult Mice
Proceedings of the Royal Society London (B) 154, 540, 1961.
28. WS. BULLOUGH:
The Control of Mitotic Activity in Adult Mammalian Tissue
Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society. 37, 307, 1962.
29. WS. BULLOUGH, EB. LAURENCE:
Mitotic Control by Internal Secretion: The Role of Chalone - Adrenaline Complex
Experimental Cell Research 33, 176, 1964.
30. WS. BULLOUGH:
The Epidermal Chalone: A Preliminary Attempt at Isolation
Experimental Cell Research 36, 192, 1964.
31. WS. BULLOUGH:
Mitotic and Functional Homeostasis - A Speculative Review
Cancer Research 25, 1693, 1965.

32. WS. BULLOUGH, T. RYTÖMÄÄ:
Mitotic Homeostasis
Nature 205, 573, 65.
33. WS. BULLOUGH:
Cell Replacement after Tissue Damage
In: C. Illingworth (Hrsg): Wound Healing, Churchill-Verlag
London 1966, Seite 43 ff.
34. WS. BULLOUGH, EB. LAURENCE:
The Vertebrate Epidermal Chalone
Nature 214, 578, 1967.
35. WS. BULLOUGH, EB. LAURENCE:
The Role of Glucocorticoid Hormones in the Control of Epidermal Mitosis
Cell and Tissue Kinetics 1, 5, 1968.
36. WS. BULLOUGH, EB. LAURENCE:
Melanocyte Chalone and Mitotic Control in Melanomata
Nature 220, 137, 1969.
37. WS. BULLOUGH, EB. LAURENCE:
Epidermal Chalone and Mitotic Control in the V x 2 Epidermal Tumour
Nature 220, 134, 1969.
38. WS. BULLOUGH:
Epithelial Repair
In: JE. Dumphy, W. van Winkle: Repair and Regeneration.
McGraw - Hill Verlag New York 1969.
39. WS. BULLOUGH, EB. LAURENCE:
Chalone Control of Mitotic Activity in Sebaceous Glands
Cell and Tissue Kinetics 3, 291, 1970.
40. WS. BULLOUGH:
Actions of Chalones
Agents and Actions 2, 1, 1971.

41. WS. BULLOUGH, JR. DEOL:
Chalone - Induced Mitotic Inhibition in the Hewitt Keratinising Epidermal Carcinoma of the Mouse
European Journal of Cancer 7, 425, 1971.
42. WS. BULLOUGH:
Ageing of Mammals
Nature 229, 608, 1971.
43. WS. BULLOUGH, JR. DEOL:
Chalone Control of Mitotic Activity in Eccrine Sweat Glands
British Journal of Dermatology 86, 586, 1972.
44. WS. BULLOUGH:
The Control of Epidermal Thickness, Part II
British Journal of Dermatology 87, 347, 72.
45. WS. BULLOUGH:
The Epidermal Chalone Mechanism
National Cancer Institute Monographies 38, 99, 1973.
47. WS. BULLOUGH, W. HONDIUS BOLDINGH, EB. LAURENCE:
Unveröffentlichte Ergebnisse nach 161.
48. Entfällt
49. Entfällt
50. MM. BURGER
Proteolytic Enzymes Initiating Cell Division and Escape from Contact Inhibition on Growth
Nature 227, 170, 1971.
51. ER. BURNS:
Initiation of DNA Synthesis in Ehrlich Ascites Tumour Cells in Their Plateau Phase of Growth
Cancer Research 28, 1191, 1968.

52. ER. BURNS:
On the Failure of Self - Inhibition of Growth in Tumours
Growth 33, 25, 1969.
53. TW. BURNS, PE. LANGLEY:
Studies in the Role of Cyclic AMP in Human Lipolysis
Advances in Cyclic Nucleotid Cancer Research 1,63,72.
54. GR. CAMERON:
Compensatory Hypertrophy of the Spleen: A Study of Splenic
Growth
Journ. Pathol. and Bacteriol. 78, 335, 1959.
55. CB. CARPENTER, AW. BOLYTON:
Immunosuppressive Alpha - Globulin from Bovine Thymus
I. Preparation and Assay
II. Mode of Action
Cellular Immunology 2, 425, 1971.
56. D. CAYER, ME. SOHMER:
The duration of Life in Patients with Tumours Metastatic to
the Liver Demonstrated by Needle Aspiration Biopsy
Cancer 9, 141, 1956.
57. SH. CHAN, D. METCALF:
Stimulation and Inhibition by Normal Human Serum of Colony
Formation in vitro by Bone Marrow Cells
British Journal of Haematology 20, 329, 1971.
58. P. CHANDRA:
Regulation des Tumorwachstums durch Adenosin - 3'-5'-mono-
phosphat
Naturwissenschaften 1972, Seite 205.
59. IN. CHERNOZEWSKI:
New Transplantable Hamster Tumour - A Squamous Cell Car-
cinoma of the Skin
Journal of National Cancer Institute 39, 1081, 1967.

60a. DP. CHOPRA, JD. SIMNETT:

Stimulation of Cell Division in Pronephros of Embryonic Grafts Following Partial Nephrectomy in the Host (*Xenopus laevis*).

Journal of Embryology and Experimental Morphology 24, 525, 1970.

60b. DP. CHOPRA, JD. SIMNETT:

Stimulation of Cell Division in Larval Kidney (*Xenopus laevis*) by Rat Kidney Antiserum

Experimental Cell Research 64, 396, 1971.

61. DP. CHOPRA, JY. RYEE:

Demonstration of a Tissue Specific Inhibitor of Mitosis of Human Epidermal Cells in vitro

The Journal of Investigative Dermatology 59, 207, 72.

62. DP. CHOPRA:

Regulation of Mitosis in the Embryonic Kidney (*Xenopus laevis*) by Kidney Growth Inhibitor (Chalone)

National Cancer Institute Monographies 38, 189, 1973.

63. DP. CHOPRA, BA. FLAXMAN:

Mitotic Inhibition of Epidermal Cells from Psoriasis Lesions in vitro by Extracts from Normal Human Skin

Journal of the National Cancer Institute 50, 281, 1973.

64. HN. CHRISTENSON, TR. RIGGS:

Concentrative Uptake of Amino Acids by Free-Cell Neoplasms

Annals of the New York Academy of Sciences 63, 983, 1956.

65. HN. CHRISTENSON, ME. HENDERSON:

Comparative Uptake of Amino Acids by Mouse Ascites Carcinoma Cells and Normal Tissues

Cancer Research 12, 229, 1952.

66. E. CHRISTOPHERS:

Cellular Architecture of the stratum corneum

Journal of Investigative Dermatology 56, 165, 1971.

67. AC. CHUNG, C. HUFNAGEL:
Some in vivo Effects of Chalone (Mitotic Inhibitor) Obtained from Lymphoid Tissues
National Cancer Institute Monographies 38, 131, 1973.
68. Y. CLERMONT, E. BUSTOS - OBRYON:
Re - Examination of Spermatogonial Renewal in the Rat by Means of Seminiferous Tubules Mounted 'in toto'
American Journal of Anatomy 122, 237, 1968.
69. Y. CLERMONT, A. GIRARD:
Existence of a Spermatogonial Chalone in the Rat Testis
Anatomical Record 175, 294, 1973.
70. Y. CLERMONT, A. MAUGER:
Existence of a Spermatogonial Chalone in the Rat Testis Cell and Tissue Kinetics 7, 165, 1974.
71. S. COHEN:
Isolation of a Mouse Submaxillary Gland Protein Accelerating Incisor Eruption and Eyelid Opening in the Newborn Animal
Journal of Biological Chemistry 237, 1555, 1962.
72. PR. COOPER, H. SMITH:
Influence of Cell - Free Ascitic Fluid and Adenosin 3'-5-Cyclic Monophosphate upon the Cell Kinetic of Ehrlich's Ascites Carcinoma
Nature 241, 457, 1973.
- 73a. F. CRICK:
Diffusions in Embryogenesis
Nature 225, 420, 1970
- 73b. G. CRILE JR:
A Speculative Review of the Role of Endocrine Imbalances in the Genesis of Certain Cancers and Degenerative Diseases
Journal of National Cancer Institute 20, 229, 1958.

74. MG. DAHL, S. SHUSTER:
A Rapid in vitro Assay of Epidermal Chalons.
Presented at Proceedings of the European Society for Dermatological Research, May 1972 (nach 162).
75. J. DE COSSE, S. GELFANT:
Noncycling Tumour Cells: Mitogenic Response to Antilymphocytic Serum
Science 162, 698, 1968.
76. C. DELESCLOSE, M. REGNIER:
Specific Effect of Epidermal Extracts on DNA-Synthesis in Tissue Culture
Presented at Proceedings of the European Society for Dermatological Research, May 1972 (Quelle: 162).
77. DL. DEWEY:
The Melanocyte Chalons
National Cancer Institute Monographies 38, 213, 1973.
78. C. DOYLE:
New Cancer Treatment Saves Mice
Observer 13, 10, 1968.
79. Entfällt.
80. H. DRUCKREY:
Pharmacological approach to carcinogenesis
In: GEW Wolstenholme, M. O'Connor (Hrsg.):
CIBA Symposium on Carcinogenesis, 1959, Seite 110.
81. JE. DUNPHY:
Some Observations on the natural Behavior of Cancer in Man
New England Journal of Medicine 242, 167, 1950.
82. M.DYM, Y. CLERMONT:
Role of Spermatogonia in the Repair of the Seminiferous Epithelium Following X - Irradiation of the Rat Testis
American Journal of Anatomy 128, 265, 1970.

83. M. EDER, P. GEDIGK (HRSG.):
Lehrbuch der Allgemeinen Pathologie und der Pathologischen Anatomie, 29. Auflage
Springer Verlag Berlin 1974.
84. K. ELGJO, H. HENNINGS:
Epidermal Chalone and Cell Proliferation in Transplantable Squamous Cell Carcinomas in Hamsters
I. In vivo Results
Virchows Archiv Abt. B Zellpathologie 7, 1, 1971.
85. K. ELGJO, OD. LAERUM:
Growth Regulation in Mouse Epidermis
I. G-2 Inhibitor Present in the Basal Cell Layer
Virchows Archiv Abt. B Zellpathologie 8, 277, 1971.
86. K. ELGJO, H. HENNINGS:
Epidermal Mitotic Rate and DNA Synthesis after Injection of Water Extracts Made from Mouse Skin Treated with Actinomycin D: Two or more Growth - Regulating Substances
Virchows Archiv Abt. B Zellpathologie 7, 342, 1971.
87. K. ELGJO, OD. LAERUM:
Growth Regulation in Mouse Epidermis
II. G-1 Inhibitor Present in the Differentiating Cell Layer
Virchows Archiv Abt. B Zellpath. 10, 229, 1972.
88. K. ELGJO, W. EDGEHILL:
Epidermal Growth Inhibitors (Chalones) in Dermis and Serum
Virchows Archiv Abt. B. Zellpath. 13, 14, 1973.
89. O. EPIFANOVA, V. TERSIKH:
On the Resting Periods in the Cell Life Cycle
Cell and Tissue Kinetics 2, 75, 1969.

90. WH. EVANS, S. WILSON:
Biochemical Characterisation of Isolated Immature Granu-
locytes from Guinea Pig Bone Marrow
Journal Reticuloendothel Soc. 9, 209, 1971.
91. HB. Fell:
Commentary on "Epidermal Chalone: Cell Cycle Specificity of
Two Epidermal Growth Inhibitors" by K. Elgjo
National Cancer Institute Monographies 38, 77, 1973.
92. I. FLORENTIN, N. KIGER:
T-lymphocyte Specificity of a Lymphocyte Inhibiting Factor
(Chalone) Extracted from the Thymus
European Journal of Immunology 3, 624, 73.
93. OS. FRANKFURT:
Effect of Hydrocortisone, Adrenaline and Actinomycin D to
the DNA Synthesis Phase
Experimental Cell Research 64, 140, 1971.
94. OS. FRANKFURT:
Epidermal Chalone
Experimental Cell Research 64, 140, 1971.
95. DJ. FRANKS, JP. MAC MANUS:
The Effect of Prostaglandins on Cyclic AMP Production and
Cell Proliferation in Thymic Lymphocytes
Biochemical and Biophysical Research Communications 44, 1177, 7
96. E. GARCIA - GIRALT:
Extraction from Bovine Spleen of Immunosuppressant with no
Activity on Haematopoietic Spleen Colony Formation
National Cancer Institute Monographies 38, 125, 1973.
97. L. GIACOMETTI, F. ALLEGRA:
The Effect of Wounding upon the Uptake of ^3H -Thymidine
by Guinea - Pig Epidermal Melanocytes
Advances in Biology in the Skin 8, 89, 1967.

99. L. GILLO, C. DIETHEIMER:
Extraction of Cancer Factor from Ehrlich - Ascites Carcinoma
Nature 211, 1422, 1966.
99. K. GÖDECKE:
Regulation des Zellzyklus
Naturwiss. Rundschau 1974, Seite 4 ff.
100. AL. GOLDSTEIN, A. GUHA:
Ontogenesis of Cell Mediated Immunity in Murine Thymocytes
and Spleen Cells and its Accelerations by Thymosin, a Thymic
Hormone
Journ. Immunol. 106, 773, 1971.
101. GJ. GOODMAN:
Effects of one Tumour upon the Growth of another
Proceedings of the American Association for Cancer
Research 2, 207, 1957.
102. DBP. GOODMAN, H. RASMUSSEN:
Cyclic Adenosin 3'-5'-Monophosphate - Stimulated Phosphorylation of Isolated Neurotubule Subunits
Proceedings of the National Academy of Science USA
67, 652, 1970.
103. RJ. GOSS:
Adaptive Growth, Logos Press, London 1964.
104. WA. GREEN:
Is Lipid Metabolism a Fundamental Feature in Tumour -
Host Relationship ?
Journal of Theoretical Biology 11, 212, 1966.
105. J. GRISHAM:
Effect of Exchange Transfusion on Labelling of Nuclei with
Thymidin - ^3H and on Mitosis in Hepatocytes of Normal and
Regenerating Rat Liver
Cancer Research 26, 1476, 1966.

106. RG. HALL:
DNA Synthesis in Organ Cultures of the Hamster Cheek Pouch
Inhibition by a Homologous Extract (Chalone)
Experimental Cell Research 58, 429, 1964.
107. KM. HALPRIN:
Epidermal "Turnover Time". A Reexamination
British Journal of Dermatology 86, 14, 1972.
108. TS. HAUSCHKA, ST. GRIMWELL:
Comparison of the Growth Curves of a Diploid Mouse Ascites
Tumour and a Tetraploid Subline of the Same Tumour
Proceedings of the American Assoc. Cancer Res. 2, 22, 1955.
109. TS. HAUSCHKA, L. REVESZ:
Quantitative Studies on the Multiplication of Neoplastic
Cells in vivo
IV. Influence of Doubled Chromosome Number on Growth Rate
and Final Population Size
Journal of National Cancer Institute 19, 13, 1957.
110. ML. HEIDRICK, WL. RYAN:
Cyclic Nucleotides in Cell Growth in vitro
Cancer Research 30, 376, 1970.
111. H. HENNINGS, K. ELGJO:
Delayed Inhibition of Epidermal DNA Synthesis after Injection
of an Aqueous Skin Extract (Chalone)
Virchows Archiv Abt. B Zellpath. 4, 45, 1969.
112. H. HENNINGS, K. ELGJO:
Hydrocortisone: Inhibition of DNA Synthesis and Mitotic Rate
after Local Application to Mouse Epidermis
Virchows Archiv Abt. B. Zellpath. 8, 42, 1971.

113. H. HENNINGS:
Commentary on "The Epidermal Chalone and Keratinising Epithelia" by EB. Laurence
National Cancer Institute Monographies 38, 69, 1973.
114. HB. HEWITT, DPS. CHAN:
Survival Curves for Clonogenic Cells of a Murine Keratinising Squamous Carcinoma Irradiated in vivo or under hypoxic Conditions
International Journal of Radiation Biology 12, 535, 1967.
115. H. HINDERER, M. VOLM:
Spezifische Hemmung der DNS-Synthese von HeLa-Zellen durch Endometrium- Extrakt
Experimental Cell Research 59, 464, 1970.
116. W. HONDIUS BOLDINGH, EB. LAURENCE:
Extraction, Purification and Preliminary Characterisation of the Epidermal Chalone: A Tissue Specific Mitotic Inhibitor obtained from Vertebrate Skin
European Journal of Biochemistry 5, 191, 1968.
117. A. HORAVA:
Haemorrhagic Necrosis Induced in a Transplanted Malignant Tumour by a Biological Fluid
Canadian Medical Association Journal 70, 676, 1954.
118. JC. HOUCK, H. IRAUSQUIN:
Lymphocyte DNA Synthesis Inhibition
Science 173, 1139, 1971.
119. JC. HOUCK:
Lymphocyte Chalone
Clin. Proc. Children's Hosp., Washington D.C. 28, 130, 1972.
120. JC. HOUCK, RL. WEIL:
Evidence for a Fibroblast Chalone
Nature New Biology 240, 210, 1972.

121. JC. HOUCK, H. HENNINGS:
Chalones, Specific Mitotic Inhibitors
FEBS Letters 32, 1, 73.
122. JC. HOUCK, RF. CHENG:
Isolation, Purification and Chemical Characterization of
the Serum Mitogen for Diploid Human Fibroblasts
Journal of Cell Physiology 81, 257, 1973.
123. JC. HOUCK:
General Introduction into the Chalone Concept
National Cancer Institute Monographies 38, 1, 1973.
124. JC. HOUCK, H. IRAUSQUIN:
Some Properties of the Lymphocyte Chalone
National Cancer Institute Monographies 38, 117, 1973.
125. JC. HOUCK, RF. CHENG:
Control of Fibroblast Proliferation
National Cancer Institute Monographies 38, 161, 1973.
126. JC. HOUCK, VK. SHARMA:
Fibroblast Chalone and Serum Mitogen (Anti-Chalone)
Nature New Biology 246, 112, 73.
127. JP. HRACHOVEC:
Chalone - Like Substances Inhibitory for Hepatoma Growth
and for Protein Synthesis by Liver Ribosomes
Federation Proceedings 32, 858, 1973.
129. OH. IVERSEN:
The Regulation of Cell Numbers in Epidermis. A Cyber-
netic Point of View
Acta Pathologica Microbiologica Scand. Suppl. 148, 91, 1961.
130. OH. IVERSEN, H. EVENSEN:
Experimental Skin Carcinogenesis in Mice
Acta Pathologica Microbiologica Scand. Suppl. 156, 1, 1962.

131. OH. IVERSEN:
Cybernetic Aspects of the Cancer Problem
Progress in Biocybernetics 2, 76, 1965.
132. OH. IVERSEN:
A Homeostatic Mechanism Regulating the Cell Number in Epidermis. Its Relation to Experimental Skin Carcinogenesis
In: Proceedings of the First Internat. Congr. Med.,
Napoli 1960, Seite 420-430.
133. OH. IVERSEN:
Kinetics of Epidermal Reaction to Carcinogen
Acta Pathologica Microbiologica Scand. Suppl. 64, 506, 1963.
134. OH. IVERSEN, E. AANDAHL:
The Effect of an Epidermis Specific Mitotic Inhibitor
(Chalone) Extracted from Epidermal Cells
wie 133.
135. OH. IVERSEN, K. ELGJO:
The Effect of Chalone on the Mitotic Rate and on the Mitotic Duration in Hairless Mouse Epidermis
In: H. Teir, T. Rytömaa: Control of Cellular Growth in
Adult Organisms
Academic Press Inc., New York 1967.
136. OH. IVERSEN:
Effect of Epidermal Chalone on Human Epidermal Mitotic Activity in vitro
Nature 219, 75, 1968.
137. OH. IVERSEN:
Wachstumsregulierung und Krebsentwicklung in der Epidermis von Mäusen
Archiv für Geschwulstforschung 32/4, 322, 1968.
138. OH. IVERSEN:
Chalones of the Skin
In: CIBA Foundation Symposium, Churchill-Verlag, 1969, Seite 29 ff.

139. OH. IVERSEN
Some Theoretical Considerations on Chalones and the
Treatment of Cancer: A Review
Cancer Research 30, 1481, 1970.
141. RM. JOHNSTONE, P. SCHOLEFIELD:
Amino Acid Transport in Tumour Cells
In: A. Haddow, S. Weinhouse (Hrsg.): Advances in Cancer Re-
search, Academic Press,
New York 1965, S. 143 ff.
142. MA. KARASEK, ME. CHARLTON:
Growth of Postembryonic Skin Epithelial Cells on
Collagen Gels
Journal of Investigative Dermatology 56, 205, 1971.
143. R. KEPP, HJ. STÄMMLER:
Lehrbuch der Gynäkologie, 10 Aufl.
Georg Thieme Verlag Stuttgart 1971.
144. AS. KETCHAM, H. WEXLER:
Experimental Study of Metastases
Journal of the American Medical Association 198, 177, 1966.
145. N. KIGER, I. FLORENTIN:
A Lymphocyte Inhibiting Factor (Chalone?) Extracted
from Thymus
National Cancer Institute Monographies 38, 135, 1973.
146. E. KIVILAAKSO, T. RYTÖMÄÄ:
The Effect of Polycythaemic Serum on the Proliferation
of Rat Bone Marrow Cells in vitro
Cell and Tissue Kinetics 3, 385, 1970.
147. E. KIVILAAKSO, T. RYTÖMÄÄ:
Erythrocytic Chalone, a Tissue Specific Inhibitor of
Cell Proliferation in the Erythron
Cell and Tissue Kinetics 4, 1, 1971.

148. G. KLEIN, E. KLEIN:

Conversion of Solid Neoplasms into Ascites Tumours
Annals of the New Academy of Sciences 63, 640, 1956.

149. G. KLEIN:

Immunological Studies on a Human Tumour
In: ED. WEISS: Immunological Parameters of Host - Tumour
Relationships
Academic-Press, New York 1971, Seite 111

150. SE. KORNGUTH, MA. STAHMANN:

Effect of Polylysine on the Leakage and Retention of Com-
by Ehrlich Ascites Tumour Cells
Ibid. 21, 907, 1961.

151. L. KRIEG:

Effect of Tumour - Promoting Phorbol-Esters and of Acetic
Acid on Mechanisms Controlling DNA-Synthesis and Mitosis
(Chalones)
Cancer Research 34 (11), 3135, 1974.

152. OD. LAERUM:

Oxygen Consumption of Basal and Differentiating Cells from
Hairless Mouse Epidermis. A New Method for Obtaining al-
most Pure Selections of Basal and Differentiating Cells
Respectively
Journal of Investigative Dermatology 52, 204, 1969.

153. AK. LAIRD:

Dynamics of Tumour Growth
British Journal of Cancer 18, 490, 1964.

154. LG. LAJTHA:

Commentary on "Chalone of the Granulocyte System", by T. Ry-
tömaa and "Granulopoiesis-Inhibiting Factor", by
WR. Paukovits.
National Cancer Institute Monographies 38, 111, 1973.

155. PK. LALA:
DNA-Synthesis Time of Bone Marrow Cells in Healthy and
Ascites Tumour - Bearing Mice
Cell and Tissue Kinetics 5, 79, 1972.
156. E. LA SALVIA, E. GARCIA-GIRALT:
Extraction of an Inhibitor of DNA-Synthesis from Human
Peripheral Blood Lymphocytes and Bovine Spleen
Rev. Europ. Etudes Clin. et Biol. 15, 789, 1970.
157. EB. LAURENCE, E. RANDERS HANSEN:
An in vivo Study of Epidermal Chalone and Stress Hormones
on Mitosis in Tongue Epithelium and Ear Epidermis of
the Mouse.
Virchows Archiv Abt. B Zellpath. 11, 34, 1972.
158. EB. LAURENCE, E. ELGJO:
Epidermal Chalone and Cell Proliferation in a Trans-
plantable Squamous Cell Carcinoma in Hamsters
II. In vitro Results
Virchows Archiv Abt. B Zellpathologie 7,8, 1971.
159. EB. LAURENCE, E. RANDERS HANSEN:
Regional Specificity of the Epidermal Chalone Extracted
from Two Different Body Sites
Virchows Archiv Abt. B Zellpath. 11, 34, 1972.
160. EB. LAURENCE, E. RANDERS HANSEN:
Systematic Factors Influencing Epidermal Mitosis
Rev. Europ. Etudes Clin. et Biol. 17, 133, 1972.
161. EB. LAURENCE:
Experimental Approach to Epidermal Chalone
National Cancer Institute Monographies 38,37, 1973.
162. EB. LAURENCE:
The Epidermal Chalone and Keratinizing Epithelia
National Cancer Institute Monographies 38, 61, 1973.

163. GF. LEONG:

Effect of Partial Hepatectomy on DNA Synthesis and Mitosis
in Heterotopic Partial Autografts of Rat Liver
Cancer Research 24, 1496, 1964.

164a. MR. LEWIS, WH. COLE:

Experimental Increase of Lung Metastases after Operative
Trauma (Amputation of Limb with Tumour)
Archives of Surgery 77, 621, 1958.

164b. R. LINDEMANN:

Erythropoieses Inhibiting Factor (EIF)
I. Fractionation and Demonstration of Urinary EIF
British Journal of Haematology 21, 623, 1971.

165. JM. LLANOS:

nach: 259

In: H. TEIR, T. RYTÖMAA (Hrsg.): Control of Cellular Growth in
Adult Organisms, Academic Press,
New York 1967.

166. CL. MARKERT, H. URSPRUNG:

Developmental Genetics, Prentis-Hall Press, New Jersey 1971.

167. F. MARKS:

Biochemie und Krebs
Hippokrates 1969, Heft 19, Seite 740.

168. F. MARKS:

Direct Evidence of Two Tissue Specific Chalone-Like Fac-
tors Regulating Mitosis and DNA Synthesis in Mouse Epidermis
Hoppe-Seylers Zeitschrift für physiol. Chemie 352, 1273, 1971.

169. F. MARKS, U. SCHMID:

Ein chalonartiger Hemmstoff für die epidermale DNA-Synthese
Hoppe-Seylers Zeitschrift für physiol. Chemie 353, 1457, 1972.

170. F. MARKS, W. REBIEN:
Cyclic 3'-5'-AMP and Theophylline Inhibit Epidermal Mitosis
in G-2 Phase
Naturwissenschaften 59, 41, 1972.
171. F. MARKS, W. GRIMM:
Disturbance by Tumour Promoters of Epidermal Growth Control
(Chalone mechanism)
Hoppe-Seylers Zeitschrift für physiol. Chemie 353, 1970, 1972.
172. F. MARKS:
The Second Messenger System of the Mouse
III. Guanyl-Cyclase
Biochemica et Biophysica Acta 309, 349, 1973.
173. F. MARKS:
A Tissue Specific Factor Inhibiting DNA Synthesis in Mouse
Epidermis
National Cancer Institute Monographies 38, 79, 1973.
174. R. MARKS, K. FUKUI:
The Application of an in vitro Technique to the Study of
Epidermal Replication and Metabolism
British Journal of Dermatology 84, 453, 1971.
175. Entfällt.
176. R. MARKS:
The Role of Chalones in Epidermal Homeostasis
British Journal of Dermatology 86, 543, 1972.
177. JM. MARRS, JJ. VOORHEES:
A Method for Bioassay of an Epidermal Chalone-Like
Inhibitor
Journal of Investigative Dermatology 56, 174, 1971.

179. JM. MARRS, JJ. VOORHEES:
Preliminary Characterization of an Epidermal Chalone-Like Inhibitor
Journal of Investigative Dermatology 56, 353, 1971.
179. G. MATHE, E. GARCIA-GIRALT:
New Data on Mechanism and Control of a Secondary Disease. Control of GVH by Donor Tolerance Induced by Soluble H-2 Antigen
Exp. Haematol. 22, 53, 1972.
- 180a. G. MATHE, N. KIGER:
Progress in the Prevention of GVH: Bone Marrow Grafts after ALG Conditioning, with Lymphocyte Split Chimerism, Use of a Lymphocyte "Chalone T", and Soluble Histocompatibility Antigens
Transplantation Proceedings 5, 993, 1973.
- 180b. J. MATTERN, K. "HAYSS:
Fehlende Bedeutung gewebsspezifischer Hemmsubstanzen ("Chalone") auf die Wachstumsregulation der teilhepatektomierten Leber
Experimentelle Pathologie 8, 384, 1973.
181. J. MAUEL, V. DEFENDI:
Regulation of DNA Synthesis in Mouse Macrophages
Experimental Cell Research 65, 377, 1971.
182. TH. MAUGH:
Chalones: Chemical Regulation of Cell Division
Science 176, 1407, 1972.
183. JA. MC CREDIE, J. KRUUV:
The Rate of Tumour Growth in Animals
Can. Journ. Surg. 29, 331, 1965.
184. RA. MENZIES, JA. KERRIGAN:
Effect of Rat Liver Chalone on Chick Embryo Cell Division
The Journal of Cell Biology 59, 224a, 1973.

185. D. METCALF:
Spleen Graft Growth in Splenectomized Rat
Australian Journal of Biology 41, 51, 1963.
186. JA. MILLER, EC. MILLER:
The Carcinogenic Aminoazo Dyes
Advances in Cancer Research 1, 339, 1953.
187. RG. MILLER, RA. PHILIPPS:
Separation of Cells by Velocity Sedimentation
Journal of Cell Physiology 73, 191, 1969.
188. JR. MÜSE, G. MÜSE:
Onkolyseversuche mit apathogenen anaeroben Sporenbildern
am Ehrlich-Tumor der Maus
Zeitschrift für Krebsforschung 63, 63, 1959.
189. U. MOHR, J. ALTHOFF:
Melanoma Regression Induced by "Chalone":
A New Tumour Inhibiting Principle Acting in vivo
Nature 220, 138, 1968.
190. U. MOHR:
Zur Frage der Verwendung von Gewebsextrakten in der
Krebsbehandlung
Langenbecks Archiv für Chirurgie 329, 275, 1971.
- 191a. U. MOHR, W. HONDIUS BOLDINGH:
Identification of Contaminating Clostridium Spores as
the Oncolytic Agent in some Chalone Preparations
Cancer Research 32, 1117, 1972.
- 191b. U. MOHR, W. HONDIUS BOLDINGH:
Oncolysis by a New Strain of Clostridium
Cancer Research 32, 1122, 1972.

192. J. MOLNAR, DW. TERGARDEN:
The Biosynthesis of Glycoproteins
VI. Production of Extracellular Radioactive Macromolecules
by Ehrlich Ascites Carcinoma Cells during Incubation
with Glucosamin - ^{14}C
Ibid. 25, 1860, 1965.
193. A. MORLEY, KA. RICKARD:
Studies on the Regulation of Granulopoiesis
IV. Possible Humoral Regulation
Blood 37, 14, 1971.
194. C. OBERLING:
The Riddle of Cancer, Yale University Press,
New Haven 1952, Seite 238 ff.
195. SK. OLVEY, CJ. MC DONALD:
The in vitro Cell Cycle of Adult Mammalian Epidermis:
A Preliminary Study
Journal of Investigative Dermatology 58, 175, 1974.
196. JW. ORR:
The Mechanism of Chemical Carcinogenesis
British Medical Bulletin 14, 99, 1958.
197. EE. OSGOOD:
A Unifying Concept of the Etiology of Leukemias, Lymphomas
and Cancers
Journal of National Cancer Institute 18, 155, 1957.
198. J. OTTEN, GS. JOHNSON:
Regulation of Cell Growth by Cyclic Adenosine - 3'-5'-Mono-
phosphate Levels in Fibroblasts
Journal of Biological Chemistry 247, 7082, 1972.

199. J. OTTEN, GS. JOHNSON:
Cyclic AMP-Levels in Fibroblasts:
Relationship to Growth Rate and Contact Inhibition of Growth
Biochemical and Biophysical Research Communications
44, 1192, 1971.
200. HM. PATT, ME. BLACKFORD:
Quantitative Studies of the Growth Response of the Krebs
Ascites Tumour
Cancer Research 14, 391, 1963.
201. WR. PAUKOVITS:
Control of Granulocyte Production: Separation and Chemical
Identification of a Specific Inhibitor (Chalone)
National Cancer Institute Monographies 38, 147, 1973.
202. WR. PAUKOVITS:
Granulopoiesis Chalone in Bone Marrow
Studia Biophysica 31, 301, 1972
203. WR. PAUKOVITS:
Chalone - Endogene Inhibitoren der Zellteilung ?
Blut 27, 217, 1973.
204. WR. PAUKOVITS:
Isolierung eines Granulopoese-Inhibitors aus peripheren
Granulozyten und Plazenta
Hoppe-Seylers Zeitschrift für physiol. Chemie 354, 1228, 1973.
205. WR. PAUKOVITS:
Granulopoiesis-Inhibiting Factor: Demonstration and Preliminary
Characterisation of a Specific Polypeptide (Chalone)
National Cancer Institute Monographies 38, 147, 1973.
- 206a. H. PINKUS:
Examination of the Epidermis by the Strip Method
III. Biometric Data on Regeneration of the Human Epidermis
Journal of Investigative Dermatology 19, 431, 1952.

206b. FA. PÖPP:

Einige Möglichkeiten für Biosignale zur Steuerung
des Zellwachstums.

Arch. f. Geschwulstforsch.

44, 295, 1975.

207. VR. POTTER:

The Biochemical Approach to the Cancer Problem

Federation Proceedings 17, 691, 1958.

208. JA. POWELL, EA. DUELL:

Beta Adrenergic Stimulation of Endogenous Epidermal
Cyclic AMP Formation

Archives of Dermatology 104, 359, 1971.

209. DM. PRESCOTT:

Regulation of Cell Production

Cancer Research 28, 1815, 1968.

210. PA. RILEY:

Hydroxyanisole Depegmentation in vitro Studies

Journal of Pathology and Bacteriology 97, 193, 1969.

211. PA. RILEY:

Mechanism of Pigment-Cell Toxicity Produced by Hydroxyani-
sole

Journal of Pathology and Bacteriology 101, 163, 1970.

212. E. ROBBINS, MD. SCHARFF:

The Absence of a Detectable G-1-Phase in a Cultured Strain
of Chinese Hamster Lung Cell

Journal of Cell Physiology 34, 684, 1967.

213. R. ROHRBACH, K. ELGJO:

Effects of Methylcholanthrene on Epidermal Growth Regulators
I. Variations in the M-Factor

Beiträge zur Pathologischen Anatomie und zur allgemeinen
Pathologie 147, 21, 1972.

214. R. ROHRBACH, M. LAU:
Zytophotometrische Messungen des DNS- und Histonprotein-
Gehaltes experimentell erzeugter Hauttumoren bei der Ratte
und der haarlosen Maus, II. Teil
Beiträge zur Pathologischen Anatomie und zur allgemeinen
Pathologie 146, 111, 1972.
215. R. ROHRBACH:
Variations of Mitosis-Inhibiting Chalone Activity in Epider-
mis after Carcinogen Treatment
Cell and Tissue Kinetics 7, 251, 1974
216. S. ROTHBERG, BC. ARP:
Epidermal Chalone and Inhibition of DNA-Synthesis
National Cancer Institute Monographies 38, 93, 1973.
217. H. RUBIN:
Fact and Theory about the Cell Surface in Carcinogenesis
In: M. Locke (Hrsg.): Major Problems in Developmental Biology
Academic Press, London 1966, Seite 317.
218. T. RYTÖMAA, K. KIVINIEMI:
In vitro Experiments for Demonstrations of Specific Feed-
back Factors in Rat Serum
Proc. XIV Scand. Congr. Path. Microbiol., Universitetsforlaget
Oslo, 1964.
219. T. RYTÖMAA, K. KIVINIEMI:
Regulation System of Blood Cell Production
In: H. Teir, T. Rytömaa (Hrsg.): Control of Cellular Growth in
Adult Organisms, Academic Press, New York 1967.
220. T. RYTÖMAA, K. KIVINIEMI:
Control of DNA-Duplication in Rat Chloroleukaemia by
Means of the Granulocytic Chalone
European Journal of Cancer 4, 595, 1969.

221. T. RYTÖMAA, K. KIVINIEMI:
Control of Granulocyte Production
I. Chalone and Antichalone, two Specific Humoral Regulators
Cell and Tissue Kinetics 1, 329, 1968.
222. T. RYTÖMAA, K. KIVINIEMI:
Control of Granulocyte Production
II. Mode of Action of Chalone and Antichalone
Cell and Tissue Kinetics 1, 341, 1968.
223. T. RYTÖMAA, K. KIVINIEMI:
Control of Cell Production in Rat Chloroleukaemia by
Means of the Granulocytic Chalone
Nature 220, 136, 1968.
224. T. RYTÖMAA, K. KIVINIEMI:
Chloroma Regression Induced by the Granulocytic Chalone
Nature 222, 995, 1969.
225. T. RYTÖMAA, K. KIVINIEMI:
Regression of Generalized Leukaemia in Rat Induced by the
Granulocytic Chalone
European Journal of Cancer 6, 401, 1970.
226. T. RYTÖMAA:
Granulocytic Chalone
Proceedings of the VIth International Symposium on
Comparative Leukaemia Research, Bibl. Haematologica Nr. 39,
Karger Verlag Basel, 1972.
227. T. RYTÖMAA:
Role of Chalone in Granulopoiesis
British Journal of Haematology 24, 141, 1973.
228. T. RYTÖMAA:
Chalone of the Granulocyte System
National Cancer Institute Monographies 38, 143, 1973.

229. Entfällt.
230. H. SAETREN:
A Principle of Auto-Regulation of Growth Production of
Organ Specific Mitose-Inhibitors in Kidney and Liver
Experimental Cell Research 11, 229, 1956.
231. H. SAETREN:
The Organ-Specific Growth Inhibition of the Tubule Cells
of the Rat's Kidney
Acta Chem. Scand. 17, 889, 1963.
232. EA. SCHÄFER:
The Endocrine Organs, Longmans, London 1916.
233. I. SCHORR, RL. NEY:
Abnormal Human Responses of an Adrenocortical Cancer Ade-
nylcyclase
Journal of Clinical Investigation 50, 1295, 1971.
234. M. SCHÜTT, P. LANGEN:
Comments on Granulocytic Chalone Action
Studia Biophysica 31-32, 311, 1972.
235. M. SEIP
Erythropoietic Inhibiting Factor (EIF)
An Erythrocytic Chalone ?
Annals of Clinical Research 3, 3, 71
236. JR. SHEPPARD:
Difference in Cyclic 3'-5'-Monophosphate Levels in Normal
and Transformed Cells
Nature New Biology 236, 14, 1972.
- 237a. W. SIEGENTHALER:
Klinische Pathophysiologie, 2. Aufl.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1973.

237b. B. SIGEL:

The Effect of Partial Hepatectomy on Autotransplanted
Liver Tissue

Surg. Gynecol. Obstet. 117, 29, 1963.

238. J. SHORT, RF. BROWN:

Induction of Deoxyribonucleic Acid Synthesis in the Liver
of the Intact Animal

Journal of Biological Chemistry 247, 1757, 1972.

239. HS. SIMMS, NP. STILLMAN:

Substances Affecting Adult Tissues in vitro

II. A Growth Inhibitor in Adult Tissues

Journal of Gen. Physiology 20, 621, 1937.

240. A. SIMARD, L. CORNEILLE:

Inhibition of DNA-Synthesis and Mitosis in Regenerating
Liver by a Hepatic Chalone

Journal of Cell Biology 59, A 317, 1973.

241. K. SIMON:

Neues über die Chalone

Naturwissenschaftliche Rundschau 1974, Heft 8, Seite 314.

242. JD. SIMNETT, AG. HEPPLER STON:

Cell Renewal in the Mouse Lung

Laboratory Investigation 15, 1793, 1966.

243. JD. SIMNETT, JM. FISHER:

Tissue-Specific Inhibition of Lung Alveolar Cell Mitosis
in Organ Culture

Nature 223, 994, 1969.

244. JD. SIMNETT, JM. FISHER:

Description of Growth Phenomena and the Formulation of
Growth Control Models

National Cancer Institute Monographies 38, 29, 1973.

245. HE. SKIPPER, HJ. MITCHELL:
Observation on Inhibition of Nucleic Acid Synthesis Resulting from Administration of Nitrogen Mustard, Urethan, Colchicine, 2,6-Diaminopurin, 8-Azaguanin, Potassium Arsenite and Cortisone
Cancer Research 11, 145, 1951.
246. DW. SMITHERS:
Control of Cellular Growth in Adult Organism
Academic Press, London 1967, Seite 357.
247. ME. SMULSON:
Influence of Adenosine Diphosphoribosylation of Histones on the Replication of Human Cells
National Cancer Institute Monographies 38, 205, 1973.
248. R. SPIELHOFF:
The Specificity of Regulation of Organ Growth:
The Effect of Tissue Extracts on the Incorporation of Tritiated Thymidine in Liver and Kidney
Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 138, 43, 1971.
249. EH. STARLING:
Die chemische Koordination der Körpertätigkeiten
Verhandlungen der Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte Band 1, Seite 246, 1906.
250. H. STICH, ML. FLORIAN:
The Presence of a Mitosis Inhibitor in the Serum and Liver of Adult Rats
Canad. Journ. Biochem. Physiol. 36, 855, 1958.
- 251a. MG. STOKER, M. SHEARER:
nach 72.
Cell. Sci. 1, 297, 1966.

- 251b. DB. STOLTZ, HF. STICH:
Viruses and Mammalian Chromosomes
VII. Persistence of a Chromosomal Instability in Regenera-
ting, Transplanted, and Cultured Neoplasms Induced by
Human Adenovirus Type 12 in Syrian Hamsters
Cancer Research 27, 587, 1967.
252. JM. TAYLOR, S. COHEN:
Epidermal Growth Factor: High and Low Molecular Weight Forms
Proceedings of the National Academy of Sciences 67, 164, 1970.
253. H. TEIR, A. LAHTIHRJON et al:
In: H. Teir, T. Rytömaa: Control of Cellular Growth in Adult
Organisms
Academic Press, New York, 1967.
255. RC. THEUER:
Effect of Essential Amino Acid Restriction on the Growth
of Female c 57 BL Mice and their Implanted BW 10232
Adenocarcinomas
Journal of Nutrition 101, 223, 1973.
- 256a. R. TSANEV:
Role of Nucleic Acids in Wound Healing Process
Sympos. Biol. Hungarica 3, 55, 1963
Presented at Symposium on Regeneration and Wound Healing, 1960.
- 256b. RW. TURKINGTON, JL. MALES:
Synthesis and Storage of Epithelial-Epidermal Growth Fac-
tor in Submaxillary Gland
Cancer Research 31, 252, 1971.
257. FL. VAUGHAN, IA. BERNSTEIN:
Studies of Proliferative Capabilities in Isolated Epi-
dermal Basal and Differentiated Cells
Journal of Investigative Dermatology 56, 454, 1971.

258. WG. VERLY, Y. DESCHAMPS:
The Hepatic Chalone
I. Assay Method for the Hormone and Purification of the
Rabbit Liver Chalone
Canadian Journal of Biochemistry 49, 1376, 1971.
259. WG. VERLY:
The Hepatic Chalone
National Cancer Institute Monographies 38, 175, 1973.
260. JA. VILPO, K. KIVINIEMI:
Inhibition of Granulopoiesis by Endogenous Granulocyte
Chalone Studied with the Diffusion Chamber Technique
European Journal of Cancer 9, 515, 1973.
261. M. VIROLAINE:
Mitotic Responses in Liver Autografts after Partial
Hepatectomy in Rat.
Experimental Cell Research 33, 588, 1964.
262. MJ. VOADEN:
A Chalone in the Rabbit Lens ?
Exp. Eye Research 7, 326, 1968.
263. MJ. VOADEN, SJ. LEESON:
A Chalone in Mammalian Lens
a. I. Exp. Eye Research 9, 57, 1970.
b. II. Exp. Eye Research 9, 67, 1970.
264. M. VOLM, V. KINZEL:
Inactivation of Tissue-Specific Inhibitors by a Carci-
nogen (Diethylnitrosamine)
Experientia 25/1, 68, 1969.
265. M. VOLM, K. WAYSS:
Zur Frage der Hemmfaktoren im Endometrium
Naturwissenschaften 9, 458, 1971.

266. M. VOLM, AD. HO:
Non-Existence of Tissue-Specific Growth Inhibitors in the
Liver-Supernatant ("Hepatic Chalone")
Exp. Path. 8, 341, 1973.
267. JJ. VOORHEES, EA. DUELL:
Regulation of Epidermal Proliferation in vitro by Epi-
nephrine, Adenylcyclase and Cyclic AMP
Federation Proceedings 30, 687, 1971.
268. JJ. VOORHEES, EA. DUELL:
The Cyclic AMP System in Normal and Psoriatic Epidermis
Journal of Investigative Dermatology 59, 114, 1972.
- 269a. JJ. VOORHEES, EA. DUELL:
Effects of Alpha and Beta Adrenergic Stimulation on Cyclic
AMP Formation and Mitosis in Epidermis
Clin. Res. 20, 419, 1972.
- 269b. JJ. VOORHEES, WS. KELSEY:
Unpublished Results
nach 270.
270. JJ. VOORHEES, EA. DUELL:
Role of Cyclic AMP in the Control of Epidermal Cell
Growth and Differentiation
National Cancer Institute Monographies 38, 47, 1973.
271. VI. VORDBEYEV:
Unfractionated Preparations of Histones from Normal Mammalian
Tissues as Agents Inhibiting Growth of Transplanting Tumours
Nature 199, 545, 1963.
272. K. WAYSS, J. MATTERN:
Elimination by the Carcinogen Diethylnitrosamine of Non-Speci-
fic Inhibitory Factors in the Regenerating Liver
Experimentelle Pathologie 8, 384, 1973.

273. K. WAYSS, J. MATTERN:
Failure to Find "Hepatic Chalone" in Adult Rat Liver
Naturwissenschaften 60, 354, 1973.
274. GD. WEINSTEIN, P. FROST:
Cell Proliferation in Human Basal Cell Carcinoma
Cancer Research 30, 724, 1970.
275. P. WEISS:
Specificity in Growth Control
In: EG. Butler (Hrsg.): Biological Specificity and Growth
University Press Princeton 1955.
276. P. WEISS, JL. KAVANAU:
A Model of Growth and Growth Control in Mathematical Terms
Journ. Gen. Physiol. 41, 1, 1957.
277. CL. WILEY:
The Effects of the Epidermal Chalone on DNA-Synthesis in
Mammalian Epidermal Cells
The Journal of Investigative Dermatology 60, 160, 1973.
278. R. WU:
Leakage of Enzymes from Ascites Tumour Cells
Cancer Research 19, 1217, 1959.
279. VA. ZIBOH, SL. HSIA:
Prostaglandin E_2 : Biosynthesis and Effects on Glucose and Lipid Metabolism in Rat Skin
Archives of Biochemistry and Biophysics 146, 100, 1971.
280. HU. ZOLLINGER:
Pathologische Anatomie, 3. Auflage
Bd. I. Allgemeine Pathologie

Zeitschriftenartikel mit fehlender Verfasserangabe:

281. Chalones: Possibly an Horse
Nature New Biology 231, 162, 1971.
282. How is the Chalone Story Ageing ?
The Lancet 1, 1248, 1973.

L e b e n s l a u f

Am 21.3.51 wurde ich als Sohn der Lydia Erbe geb. Ellenberg und des Vikars Gerhard Erbe in Heimboldshausen, Kreis Hersfeld geboren.

Im Jahre 1953 übersiedelten wir nach Obersuhl, Kreis Rotenburg/Fulda, wo mein Vater seine erste Pfarrstelle antrat. Wir blieben bis zum Jahre 1958 in diesem Ort nahe der Zonengrenze; während dieser Zeit vergrößerte sich die Familie durch meine Schwester Gisela (1953) und meinen Bruder Thomas (1956). Im Jahre 1957 wurde ich in die Bürgerschule Obersuhl eingeschult.

Im Jahre 1958 erfolgte der Umzug nach Kassel; dort trat ich 1961 in das altsprachliche "Friedrichsgymnasium" ein. An derselben Schule legte ich 1969 meine Reifeprüfung ab, zunächst mit dem Ziel, Jura zu studieren. Ich immatrikulierte mich in Gießen zum Wintersemester 1969/70. Schon nach wenigen Wochen stellte ich jedoch fest, daß mich weder Studium noch Berufsmöglichkeiten dieses Faches befriedigen würden.

Für das Sommersemester 1970 erhielt ich die Zulassung zum Medizinstudium in Marburg; das Vorphysikum bestand ich nach dem Wintersemester 1970/71, das Physikum legte ich im Sommersemester 1970 ab.

Seither stehe ich im klinischen Teil meines Studiums.

Zum Wintersemester 1975/76 werde ich mich beim Ärztlichen Prüfungsausschuß zur Absolvierung des Staatsexamens melden.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren

Professoren und Dozenten:

AMON, ARNDT, AURICH, AZIZ, BLANKE, BOMMER, BUCHHOLZ, BUSCH,
CASTENHOLZ, DAUME, DEHNICKE, DIMROTH, DITTRICH, EIGNER,
EXNER, FRIEDRICH, GANZ, GERDES, GEUS, GLANZ, GOLENHOFEN,
GOTTESBÜREN, GRAUL, HABERICH, HAMELMANN, HARDEWIG, HAVEMANN,
HENSEL, HERING, HESS, HILDEBRANDT, HILGERMANN, HORT, JAKOB,
KAFFANIK, KARLSON, KLAUS, KLEIN, KLEINSASSER, KOECKE, KOEHLER,
KORANSKY, LANGE, LINNEWEH, LORENZ, MAROSKE, MARTINI, NESSWETHA,
NEUMANN, OEPEN, POPP, POTS, REMSCHMIDT, RICHTER, RIECKEN,
RODECK, ROHEN, ROSENTAL, SCHIFF, SCHLEYER, SCHNEIDER, SEIDEL,
SIEGERT, STRAUB, THOENES, UHLARIK, WALCHER, WEBER, WEHRMEYER,
WELGE-LÜSSEN.

City Schnelldruck, Marcusstraße 10, 8700 Würzburg